

Aus der Augenklinik
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub)

**Der Metabolitgehalt von Epithel und Stroma der
Kaninchencornea und seine Veränderung unter
verschiedenen experimentellen Bedingungen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von
Fritz Wernhart Schmidt
aus Barkhausen-Porta

Marburg 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub)

**Der Metabolitgehalt von Epithel und Stroma der
Kaninchencornea und seine Veränderung unter
verschiedenen experimentellen Bedingungen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von
Fritz Wernhart Schmidt
aus Barkhausen-Porta

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg am
29.6.67

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Heuser
Referent: Doz. Dr. M. Reim
Correferent: Prof. Dr. W. Straub

Meinen Eltern in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. Die allgemeine Funktion der Hornhaut (Übersicht).....	1
2. Der Aufbau der Hornhaut.....	2
3. Der Inhalt der einzelnen Teile der Horn- haut mit besonderer Berücksichtigung ei- niger chemischer Elemente und 'aktiver Stoffe' in Epithel und Stroma.....	5
4. Der Stoffwechsel der Hornhaut.....	6
5. Das Problem der Transparenz und die Funktion der Grenzmembranen.....	8
II. Fragestellung	10
1. Die Notwendigkeit der biochemischen Differenzierung zwischen Epithel und Stroma.....	10
2. Die Prüfung der Veränderlichkeit des Metabolitmusters im Corneaepithel bei Regeneration und Kryobehandlung.....	11

III. Methodik13

1. Präparation des Hornhautepithels.....13

- a) Abrasio eines normalen Epithels in vivo.....13
- b) Abrasio eines normalen Epithels nach Frierstop.....14
- c) Untersuchung eines frisch regenerierenden Epithels nach dem Frierstopverfahren.....16
- d) Abrasio eines normalen Epithels nach vorhergehender Vereisung und Frierstop (Variation der Zeitspanne).....16

2. Präparation des Hornhautstromas.....17

3. Bildserie: das Verhalten der Cornea nach Einfrieren.....18

4. Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe.....21

- a) Stroma.....21
- b) Wärmeabradat.....21
- c) Epithelien nach Frierstop.....22

5. Bestimmung der Metabolite im Extrakt und ihre Bedeutung.....24

- A. L(-)-Malat, L(-)-Glycerin-1-phosphat und L(+)-Lactat.....24

	Seite
B. L(+)-Lactat.....	29
C. Adenosintriphosphat, Glucose-6-phosphat.....	30
D. Dihydroxyacetonphosphat, Fructose-diphosphat, Adenosindiphosphat, Adenosinmonophosphat.....	33
E. Glucose.....	36
6. Das Gewicht der Hornhaut.....	39
7. Statistik.....	42
IV. E r g e b n i s s e	44
1. Die Metabolitgehalte des Hornhautstromas in vivo.....	44
2. Die Metabolitgehalte des in situ abradierten Hornhautepithels des Kaninchens.....	44
3. Die Metabolitgehalte eines normalen Epithels vom Kaninchen nach Frierstop..	46
4. Die Metabolitgehalte eines regenerierenden Epithels nach Abrasio in situ, nach Frierstop.....	47
5. Die Metabolitgehalte eines eingefrorenen und wiederaufgetauten Epithels in vivo. Präparation nach Frierstop.....	47

6. Veränderungen der Metabolitgehalte eines eingefrorenen und wiederaufgetauten Epithels in der Zeit nach dem Wiederauftauen.....	48
V. D i s k u s s i o n	51
1. Die Gehalte der Metabolite in der Gesamcornea und ihre Beziehung zueinander.....	51
2. Vergleich von Epithel und Stroma.....	53
3. Die Veränderlichkeit der Metabolite in den einzelnen Versuchsgruppen unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens der Adenosinphosphate.....	54
4. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	56
5. Die Beziehung zwischen Struktur und Metabolitmuster.....	58
VI. Z u s a m m e n f a s s u n g	61
M e t h o d i s c h e r A n h a n g	
(Tabellen der Einzelwerte)	
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	

I. Einleitung

Die Cornea als Teil des Augenorgans hat eine doppelte physiologische Funktion, einmal gehört sie zur Augenwandung und hat damit die Aufgabe eines Stützgewebes, zum anderen ist sie ein Teil des optischen Systems des Auges, wobei ihre Durchsichtigkeit, ihr etwas erhöhter Brechungsindex und ihre gewölbte Oberfläche dieser optischen Aufgabe Rechnung tragen. In der klassischen Einteilung unterscheiden wir fünf Schichten der Hornhaut: Epithel, Bowman'sche Membran, Stroma, Descemet'sche Membran und Endothel, wobei jeder einzelnen Schicht eine Teilaufgabe im Rahmen der physiologischen Gesamtfunktion zugeordnet werden kann.

	Anzahl der Zellagen im Epithel	Epithel- Durch- messer	Gesamt- Durch- messer	Verhält- nis: Epithel/ Cornea
Mensch	5 - 8	32	550	1 : 17
Kanin- chen	6 - 8	45	530	1 : 12
Rind	9 - 11	100	1080	1 : 11
Pferd	10 - 12	130	860	1 : 6,5

Tab. 1:

Größenverhältnisse in Epithel und Gesamtcornea in
(modifiziert nach VIRCHOW und CALMETTES).

Tab. 1 gibt eine Übersicht über Größenverhältnisse in der Gesamthornhaut und im Epithel beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten.

Das Epithel besteht aus drei Zellschichten, erstens den Basalzellen, zweitens den Intermediär- oder Flügelzellen und drittens den oberflächlichen Zellen, wobei die Übergänge zwischen den drei Zellformen fließend sind. Die Zellen der Basallage scheinen langsam unter stetiger Veränderung ihrer Form und Funktion an die Oberfläche zu wandern und werden dann abgestoßen. HANNA und O'BRIEN berechneten mit Hilfe von Tritium-markiertem Thymidin eine mittlere Lebensdauer der Epithelzellen von 3,5 bis 7 Tagen, Während sich im Corneaepithel des Kindes noch reichlich langgestreckte Mitochondrien finden (KANDORI, OKAMOTO), werden sie beim Erwachsenen spärlicher (JAKUS, RHODIN), ihre Anzahl scheint sich auch je nach dem Aktivitätsgrad zu verändern (TENG). Elektronenmikroskopische Bilder weisen auf ein stark ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum mit einer großen Zahl von Ribosomen hin (RHODIN, JAKUS, TENG). Die Anzahl der Zellorganellen nimmt gegen die oberflächliche Zellschicht hin stark ab, auch die Form und der Chromatingehalt der Zellkerne ändern sich, es tritt jedoch keine Kernpyknose ein (CALMETTES), vielmehr haben die oberflächlichen Zellen neben ihrer Schutzfunktion noch wichtige optische Aufgaben: feinste zytoplasmatische Vorstülpungen sind für das Haften des cornealen Flüssigkeitsfilms von Bedeutung (AONO, PEDLER), die resultierende außerordentliche Glätte

der Oberfläche ist für eine einheitliche Brechkraft äußerst wichtig (MAURICE). TENG beschrieb eine weitere Epithelzellform, den 'dunklen Zelltyp', der sich durch eine starke Osmiophilie und ein hochdifferenziertes endoplasmatisches Retikulum auszeichnet. Er ordnet diesen Zellen eine apokrine Sekretfunktion zu. Andere Autoren bestreiten die Existenz dieses Zelltyps (CALMETTES).

Die Basalmembran des Epithels läßt sich elektronenmikroskopisch in eine innere Retikulinfaserschicht und eine homogene osmiophile Aussenschicht aufteilen (TENG); sie ist für das Haftbleiben des Epithels von Bedeutung.

Hinter der Basalmembran scheint die Bowman'sche Membran als 'modifizierte Stromaschicht' an Bedeutung zurückzubleiben, bei vielen Säugern fehlt sie überhaupt (JAKUS, CALMETTES).

Das Bild des Stromas wird beherrscht von der sehr regelmäßigen Faserarchitektur der Stromalamellen, die sich aus gebündelten Fibrillen zusammensetzen und ununterbrochen von Limbus zu Limbus laufen. Insgesamt besteht das menschliche Stroma aus etwa 100 Lamellen von 5μ Dicke (NAYLOR). Bei Anschwellen der Cornea bleibt die elektronenmikroskopische Struktur und Dicke der Fibrillen unverändert, nur die dazwischenliegende Kittsubstanz, die sich aus Mucopolysacchariden zusammensetzt, verändert sich (SCHWARZ). Undurchsichtig-

keit der Cornea kommt durch Veränderung von Kittsubstanz und Fibrillen bzw. der Verschiebung des Verhältnisses zwischen beiden zustande (SCHWARZ). JAKUS und ROHEN nehmen an, daß die Stromalamellen von den Stromazellen synthetisiert werden. Wir finden im Hornhautstroma zwei Arten von Zellen, einmal die eben erwähnten Stromazellen, die Ähnlichkeit mit Fibrozyten aufweisen (ROHEN, VIRCHOW), und zum anderen in geringer Anzahl polymorphkernige Leukozyten (VIRCHOW, WEIMAR), die das Stroma durchwandern.

An das Stroma schließt sich innen die Descemet'sche Membran an, eine 'hypertrophierte Basalmembran' (ROHEN), die elektronenmikroskopisch hexagonalen Gitteraufbau zeigt (JAKUS).

Das Endothel besteht aus einer einschichtigen kubischen Zellage. Im elektronenoptischen Bild sieht man im Endothel bedeutend mehr Mitochondrien als in den Epithelzellen (JAKUS). Es lassen sich hier wie in anderen Zellen, in denen Wasser aktiv transportiert wird (Glandula submaxillaris, Epithel des Plexus chorioidalis) die α -Cytochromen nachweisen, die sich durch Osmiophilie auszeichnen (JAKUS). STAUBESAND fand zahlreiche pinocytotische Bläschen, die ebenfalls für aktiven Flüssigkeitstransport sprechen.

Den geschilderten verschiedenen morphologischen Systemen können auch chemische und vor allem biochemische Unterschiede der verschiedenartigsten Stoffe zugeordnet werden.

Substanz	Gesamt- cornea	Epithel	Stroma	Verhältnis: Epithel/ Stroma
Ascorbin- säure	1760	3980	910	4,4 : 1
Riboflavin	-	5	1	5 : 1
Thiamin	12	100	6	16,7 : 1
Acetylcho- lin	86	765	2,5	286 : 1
Glutathion	815	4160	163	25,5 : 1

Tab. 2:

Vitamine und andere 'Wirkstoffe' in der Gesamtcornea, Epithel und Stroma.

Dimension in n Mol/g Frischgewicht

(modifiziert nach SÜLLMANN)

Die in Tab. 2 aufgezählten Substanzen haben einerseits, wie z.B. die Ascorbinsäure, Riboflavin und Thiamin im Stoffwechsel als Coenzyme und Redoxkatalysatoren des biochemischen Redoxsystems (KARLSON) wichtige Funktionen zu erfüllen, zum anderen sind sie aber auch für nervöse Einflüsse, denen besonders die Corneaepithelzellen unterliegen, von grosser Bedeutung. Dabei ist der Reichtum des Epithels an Acetylcholin bemerkenswert, überhaupt wird das Corneaepithel als das acetylcholinreichste Gewebe angesehen (VON BRÜCKE et al.). Ebenfalls für den Stoffwechsel wichtig, wenn auch nur in geringer Konzentration, sind die Schwermetallionen, die in

vielen biochemischen Reaktionen als Teil der prosthetischen Gruppe von Fermenten enzymatische Funktionen erfüllen.

	Gesamt- cornea	Epithel	Stroma	Verhältnis: Epithel/ Stroma
Fe	46	110	35,2	3,1 : 1
Cu	27,5	71	20,5	3,4 : 1
Zn	17,8	31,6	9,8	3,2 : 1

Tab. 3:

Einige Schwermetallelemente in Gesamtcornea, Epithel und Stroma des Rindes.

Dimension in nMol/g Frischgewicht
(nach FISCHER aus SÜLLMANN)

Wie Tab. 3 zeigt, haben die Schwermetalle im Epithel eine dreimal so hohe Konzentration wie im Stroma.

Durch Einführung des enzymatisch-optischen Tests durch WARBURG und BÜCHER hat sich unser Wissen über die Stoffwechselvorgänge im Gewebe beträchtlich erweitert. Auch in der Hornhaut scheinen alle Stoffwechselwege - Glykolyse, Zitronensäurezyklus und Hexosephosphat-Shunt - lokalisiert zu sein. ROHEN und CALMETTES haben histochemisch, KAMAI und REIM biochemisch die Existenz von Glykogen im Corneaepithel nachweisen können und damit auf einen

wichtigen Energiespeicher des Energie liefernden Stoffwechsels hingewiesen. LANGHAM konnte in Bilanzversuchen die Gesamtumsätze - Atmung und Glykolyse - für die ganze Hornhaut, Epithel und Stroma bestimmen. Danach steigt die Lactatproduktion unter anaeroben Bedingungen in der Gesamthornhaut von 264 auf 480 $\mu\text{Mol/g}$ feucht/min und im Epithel von 1840 auf 3800 $\mu\text{Mol/g}$ feucht/min auf den doppelten Wert an, während dieselben anaeroben Bedingungen im Stroma kaum Veränderungen in der Lactatproduktion hervorrufen. Ein wichtiger Hinweis, daß das Hornhautepithel eine größere Stoffwechselaktivität als das Stroma aufweist, gelang REIM durch die Aufstellung eines Enzymmusters von Epithel und Stroma.

	Epithel	Stroma
LDH	5125,00 ⁺ 463,00	49,20 ⁺ 5,70
GDH	0,96 ⁺ 0,23	0,15 ⁺ 0,02
ALD	5,42 ⁺ 0,36	0,27 ⁺ 0,06
TIM	955,00 ⁺ 164,00	56,80 ⁺ 18,00
GAPDH	575,00 ⁺ 67,00	5,90 ⁺ 0,29
PGK	177,00 ⁺ 52,00	10,00 ⁺ 0,55
ENO	632,00 ⁺ 101,00	6,45 ⁺ 1,49
PK	70,40 ⁺ 14,70	0,44 ⁺ 0,07
HK	2,70 ⁺ 0,50	-
AdK	18,50 ⁺ 2,60	2,56

Tab. 4:

Enzymaktivitäten in Epithel und Stroma der Kaninchenhornhaut.

Dimension in $\mu\text{Mol/g}$ feucht/min; $M \pm S_M$
(nach REIM)

Tab. 4 zeigt die Auswahl einiger Enzymaktivitäten und macht deutlich, daß der Anteil des Epithels an diesen Aktivitäten sehr viel höher ist als der des Stromas. Die Bestimmung der Enzyme ist vor allem deshalb wichtig, weil man von ihr Rückschlüsse auf den Weg der Substrate und damit auf die Produktion von chemischer Energie ziehen kann. Gleichzeitig kann niedrige Enzymaktivität eine Regulation im Sinne einer Ventilwirkung ausüben. Mit Hilfe von C_1 - und C_6 -markierter Glucose haben KINOSHITA und MASURAT gezeigt, daß etwa 66 % der Glucose über die Glykolyse und 33 % über den Hexosephosphat-Shunt abgebaut werden.

Die Frage der Funktion der Grenzmembranen prüften MAURICE und GIARDINI dadurch, daß sie Epithel und Endothel abschabten. Die Folge davon war, daß das zurückbleibende Stroma bis auf seine doppelte Dicke anschwell, etwa zwei Tage auf diesem Niveau blieb und dann mit fortschreitender Regeneration der Grenzschichten wieder zu seiner ursprünglichen Dicke zurückkehrte. Den gleichen Effekt, nämlich Quellung und Anschwellen, erreichten HARRIS und DAVSON dadurch, daß sie die Cornea auf 0° bzw. 7° C abkühlten, bei Wiedererwärmen verschwand diese Veränderung wieder. PHILPOT spritzte Stoffwechselgifte wie Monojodacetat (JAA), NaJ , 2,4-Dinitrophenol (DNP) in die Vorderkammer und erzielte dadurch ebenfalls ein Ödem der Cornea. MAURICE nimmt an, daß die Aufhebung der Transparenz bei Corneaödem auf eine Störung der geometrischen

Ordnung der Fibrillen- und Micellenstruktur durch vermehrte Hydratation der interfibrillären Mucoide zurückzuführen ist. Offensichtlich verhindern die Grenzschichten, wenn sie nicht mechanisch, toxisch, durch Temperaturgefälle oder p_H -Verschiebungen (VON WALBEEK, PIRIE und VAN HEYNINGEN) geschädigt und damit funktionsuntüchtig werden, daß sich das bestehende kolloidosmotische Druckgefälle zwischen Stromamucopolysacchariden und den umgebenden Flüssigkeiten (Kammerwasser, Tränenflüssigkeit) ausgleichen und Wasser sowie K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Ionen einströmen können (HEDBYS, MAURICE, MISHIMA, SÜLLMANN, DAVSON, HARRIS, PAU). Dieser Schwellungsdruck ('swelling-pressure') wird von PAU mit 865 mm H_2O angegeben und ist damit doppelt so hoch wie der kolloidosmotische Druck des Serums (330 mm H_2O). Diesem Druck kann ein erhöhter Augeninnendruck entgegenwirken und so die Quellung verhindern bzw. abschwächen (PAU). Epithel und Endothel scheinen also eine aktive Pumpwirkung auszuüben, für die dauernd chemische Energie bereitgestellt werden muß. Da die Mechanismen des aktiven Transports auch heute noch nicht restlos geklärt sind, hat man sich eine Hypothese geschaffen, die zugleich einen Elektrolytmechanismus (Na-Pumpe) und eine Wasserpumpe annimmt (HARRIS). Dabei scheint das Endothel die größere Pumparbeit zu leisten, während das Epithel die größeren Energiiereserven beherbergt (MAURICE). Das weist auf die Abhängigkeit der Funktion der Hornhaut von einem intakten Energiestoffwechsel hin.

II. F r a g e s t e l l u n g

Die eben aufgeführten Befunde zeigen deutlich, daß die Rollen, die Epithel und Stroma beim Stoffwechselgeschehen spielen, sehr unterschiedlich sind. REIM und LICHTÉ stellten ein Metabolitmuster für die Gesamthornhaut auf (s. Kapitel IV). Ein solches Muster gibt in anschaulicher Form die Metabolite, einen bildhaften Vergleich ihrer Gehalte und ihre Beziehung zueinander wieder. Ein einziges Muster reicht jedoch für die Betrachtung der dynamischen Veränderungen in den einzelnen Teilgeweben der Cornea nicht aus. Es mußte daher versucht werden, den Gehalt der Metabolite für Epithel, Stroma und Endothel isoliert zu bestimmen. Erst der unterschiedliche Gehalt vieler Metabolite in den drei erwähnten Geweben erlaubt es, Rückschlüsse auf die Energieproduktion und den Energieverbrauch zu ziehen. Dabei wurde angenommen, daß diese drei Gewebstypen ähnlich ihrem morphologischen Aufbau auch in ihrer biochemischen Reaktionsform verschiedenes Verhalten zeigen würden. Leider war uns aus methodischen Gründen eine isolierte Betrachtung des Endothels nicht möglich. Deshalb wollen wir bei unserer Untersuchung dem Epithel das Stroma mit anhängendem Endothel gegenüberstellen.

Ein weiteres Untersuchungsobjekt stellten die Veränderungen und Verschiebungen der Metabolitgehalte dar, die nach Schädigung des Epithels auftraten. Zuerst erschien uns die Analyse eines regenerierenden Epithels wichtig, zumal LA TESSA dort eine beträchtliche Zunahme der Zahl und Grösse der Mitochondrien festgestellt hatte. Es sollte entschieden werden, ob dieser morphologischen auch eine biochemische Veränderung zugeordnet werden könne.

Zum anderen schien uns das Verhalten des Epithels in der Kälte wichtige Hinweise auf die therapeutischen Möglichkeiten der Kryotherapie zu geben. Diese therapeutische Methode, die sich in der Dermatologie vor allem in der Behandlung von Verrucae, Condylomata und Basaliomen bewährt hat, scheint auch in der Ophthalmologie eine zunehmend wichtige Rolle zu spielen (STRAUB). Seit 80 Jahren haben viele Autoren Veränderungen und Schädigungen der Hornhaut und besonders des Hornhäute epithels durch die Kälte beobachtet (BULL, DE LAVIGERIE, VON HERRENSCHWAND, FREYTAG, CARROL). 1961 beschrieb KRZAWICZ die Methode der Kryoextraktion der Linse bei Katarakt. Es ist das Verdienst von STRAUB, die Möglichkeit der Hornhautbehandlung durch die Kälte erkannt zu haben. STRAUB wandte diese Methode besonders bei schweren Hornhauterkrankungen des Menschen an, wobei er mit einem Metallinstrument, das vorher in flüssigem Stickstoff auf -186° C abgekühlt war, die erkrankten Teile der Hornhaut für einige Sekunden einfrohr. Da TANAKA und AONO im elektro-

nenmikroskopischen Bild einer gefrorenen Hornhaut Veränderungen im Zellkern, Protoplasma und Mitochondrien in Form von Degenerationen und Vacuolisierungen sahen, waren meßbare biochemische Veränderungen im Corneaepithel nach Vereisung zu erwarten.

III. M e t h o d i k

1. Präparation des Hornhautepithels

Als Versuchstiere verwandten wir Kaninchen, da in vivo Versuche, wie sie zum Teil für uns unumgänglich waren, an ihnen leicht ausgeführt werden konnten. Die Tiere hatten ein Körpergewicht von 3 bis 4 kg und gehörten einem in Marburg gezüchteten Wildstamm an. Bei einem Versuch verwandten wir jeweils beide Augen eines Tieres.

a) Abrasion eines normalen Epithels in vivo

Zur Narkose injizierten wir dem Tier 3 bis 4 ml einer Nembutal-Lösung (Firma Abbot GmbH, Frankfurt/Main) intravenös in eine freigelegte Ohrvene.

Dabei war neben einer optimalen Dosierung auch eine langsame Verabfolgung angezeigt, um einen sofortigen Exitus des Tieres infolge kompletter Atemlähmung zu vermeiden. Unter Nembutal-Narkose verschlechtern sich die Kreislaufverhältnisse nur unwesentlich und

das Excitationsstadium des Tieres trat in gedämpfter Form auf. Nach etwa 3 bis 5 Minuten hatte das Tier die optimale Narkosetiefe erreicht. Um an den Augen des Tieres die Schmerzempfindung zu reduzieren, wurden 3 Tropfen einer 0,4 %igen Novesin^(R)-Lösung (Firma Wander, Frankfurt/Main) als Lokalanästhetikum auf die Hornhaut aufgetropft. Nun wurde mit einer Bulbusfaß-Pinzette der Musculus rectus superior hart am Limbus gefaßt, der Bulbus leicht luxiert und mit einer weiteren Faßpinzette fixiert. Zur Abrasio benutzten wir ein Graefe-Messer bzw. ein Hockey-Messer, die ja in der Augenheilkunde ebenfalls zur Abrasio menschlichen Hornhautepithels verwandt werden. Dabei schabten wir leicht vom Limbus zentralwärts, so daß alle Schabbewegungen radiär von der Hornhautperipherie zum zentralen Cornealabschnitt verliefen. Den dort so entstandenen Epithelzellhaufen überführten wir in flüssigen Stickstoff.

b) Abrasio eines normalen Epithels nach Frierstop

Um eine weitgehende Zerstörung des epithelialen Zellverbandes zu umgehen, war es angezeigt, die Epithelzellschicht möglichst in lückenlosem Gewebsverband einzufrieren.

Dabei wurde das Tier mit einer i.v. Dosis von 500 mg Evipan (Firma Bayer, Leverkusen) getötet. Wir enucleierten sofort beide Bulbi, indem wir die Conjunctiva von der Sclera am

Limbus lösten und Augenmuskeln und Nervus opticus durchtrennten. Dann perforierten wir den Bulbus nahe dem Nervus opticus und fixierten ihn mit einer Pinzette. Das bei direkter Überführung von lebenswarmem Gewebe in flüssigem Stickstoff auftretende LEIDENFROST-Phänomen, das ein sofortiges und schnelles Durchfrieren verhindert, wird durch Verwendung von Metallblöcken mit ihrer relativ hohen Wärmeleitfähigkeit verhindert (ERÄNKÖ). Wir verwandten zu diesem Zweck einen in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumstempel, den wir mit glatter Fläche auf die Hornhaut aufdrückten. Ein Teil des Glaskörpers quoll durch die vorher gesetzte Inzisionsstelle, die Hornhaut verlor ihre halbkugelförmige Konfiguration und fror flächenförmig an den Stempel an (s. Abb.).

Wir überführten den gesamten Bulbus, der zwischen Faßpinzette und Aluminiumstempel fixiert war, in ein weites Dewar-Gefäß, wo er innerhalb weniger Sekunden einfror und so fest an der Pinzette haften blieb. Jetzt konnte unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser mit einem starken Skalpell die Epithelschicht abgeschabt werden, welche sich leicht in etwa sandkorn- bis stecknadelkopfgroßen Stücken von der unter ihr liegenden, etwas dunkler erscheinenden Stromaschicht abschilfern ließ.

c) Untersuchung eines frisch regenerierenden
Epithels nach dem Frierstopverfahren

Grundsätzlich gingen wir im ersten Teil des Versuches in der gleichen Weise vor wie beim normalen Wärmeabradat (s. Kapitel III, 1 a), jedoch wurde durch eine Fluoresceinfärbung geprüft, ob tatsächlich das gesamte Epithel entfernt worden war. Diese Anfärbung wiederholten wir solange, bis der anfärbbare Defekt verschwunden war, worauf nun die unter Kapitel III, 1 b beschriebene Methode wiederum zur Anwendung kommen konnte.

d) Abrasio eines normalen Epithels nach vorher-
gehender Vereisung und Frierstop

Um das Verhalten des Hornhautepithels nach Vereisung und Wiederauftauen zu prüfen, wurde eine Fläche des Aluminiumstempels zu einer der Konvexität der Hornhautfläche entsprechenden konkaven Form geschliffen. Die Hornhaut des enucleierten Bulbus konnte so eingefroren werden. Nach Wiederauftauen und Wiederaufklaren wurde der Bulbus gemäß der in Kapitel III, 1 b beschriebenen Technik behandelt. Um das Verhalten einer einmal eingefrorenen Hornhaut nach verschiedenen Zeitabschnitten zu prüfen, wurde die Hornhaut des narkotisierten und lokalanästhetisierten Tieres in vivo eingefroren und nach verschiedenen Zeitabschnitten, gemäß der unter Kapitel III, 1 b beschriebenen Methode, präpariert.

A n h a n g z u K a p i t e l I I I , 1 b

(Abb. 1 a und 1 b)



Abb. 1 a:
 Mikroskopische Aufnahme eines Hornhautquer-
 schnitts. Zustand nach Epithelabrasio.
 Das Epithel ist vollständig abradiert.
 Vergr. 150-fach

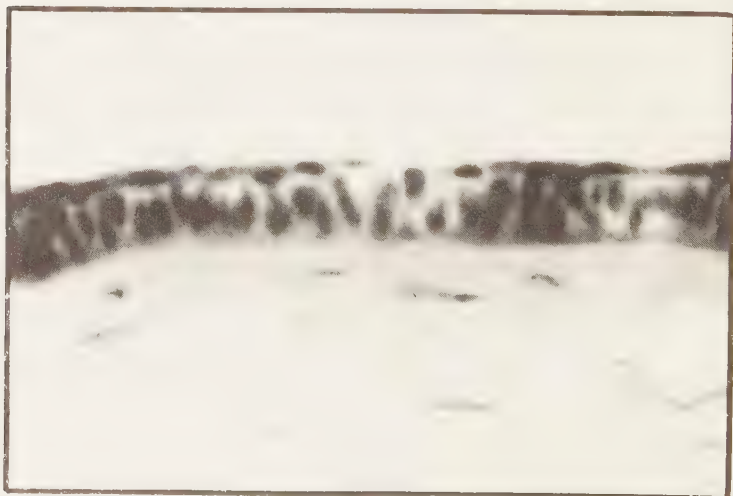


Abb. 1 b:
 Mikroskopische Aufnahme eines regenerierenden
 Epithels. Es sind vornehmlich die großen Kerne
 der Basalzellschicht zu erkennen. Darüber ist
 nur noch eine Zellschicht mit flachen Kernen
 zu erkennen.
 Vergr. 300-fach

2. Präparation des Hornhautstromas

Nach der unter Kapitel III, 1 a beschriebenen Abrasio töteten wir das Tier durch Luftembolie, eröffneten die Vorderkammer nach Art eines cornealen Starschnittes und exzidierten danach mit einer Schere in etwa 1 mm Limbusabstand die Hornhaut (Stroma und Endothel). Dabei mußte darauf geachtet werden, daß keine großen Hornhautläsionen vom Rande her (Defekte durch Pinzette!) eintraten. Sofort nach Exzision wurde das Gewebe in flüssigen Stickstoff getaucht, wo es nach wenigen Sekunden einfrohr.

3. Bildserie: Das Verhalten der Cornea nach Ein-
frieren



Abb. 2 a:

Der enucleierte Bulbus wird mit einer Pinzette perforiert und fixiert. Zustand unmittelbar vor Aufdrücken des in flüssiger Luft gekühlten Stempels.

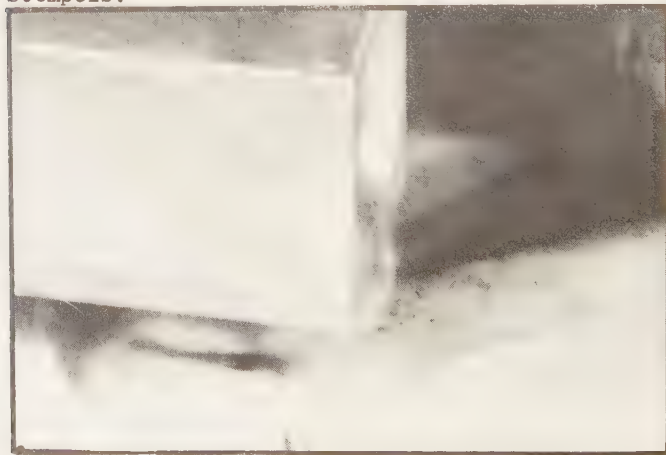


Abb. 2 b:

Der Stempel wird aufgedrückt.

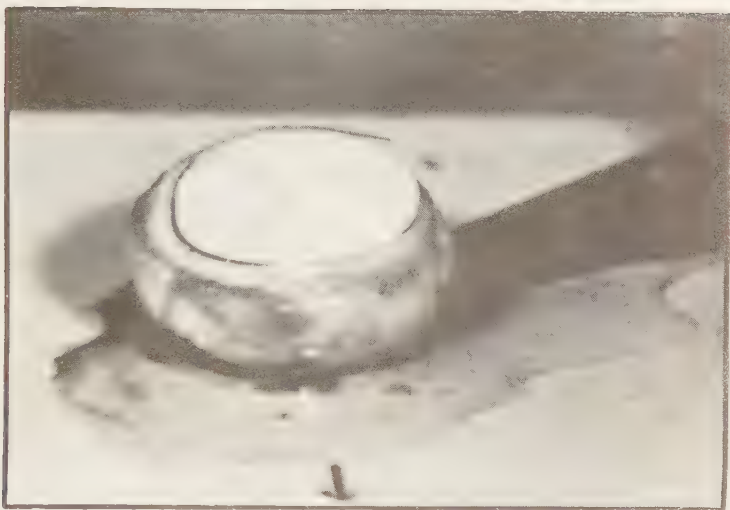


Abb. 2 c:
Der eingefrorene Bulbus mit eingefrorener Cornea
unmittelbar nach Abnahme des Stempels.



Abb. 2 d:
Langsames Auftauen des Bulbus von der Peripherie
her. Zeit: 45 sec nach Abnahme des Stempels.



Abb. 2 e und 2 f:
Weiteres Auftauen. Zeit: 75 bzw. 105 sec nach
Abnahme des Stempels. Hornhaut wieder klar und
glänzend.

4. Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe

a) Stroma

Die Extraktion der Metabolite aus dem Stroma (+ Endothel) wurde gering nach der von REIM und LICHTER angegebenen Methode der Metabolitextraktion aus der Gesamthornhaut modifiziert. Die hartgefrorenen Teile des Stromas zerkleinerten wir unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser und rührten sie sorgfältig in 3,0 ml eiskalter 0,5 n HClO_4 ein, welche in einem Gläschen vorgewogen worden war (Leergewicht). Nach weiterem Wiegen (Vollgewicht) wurde das zermörser-te Gewebe 4mal 15 sec im Eisbad mit dem Ultraturrax (Firma Janke und Kunkel, Stauffen/Breisgau) homogenisiert. Zentrifugierung, Neutralisation und Lagerung wie unter Kapitel III, 4 b, jedoch wurde diesmal mit 1,5 ml 0,5 n HClO_4 nachextrahiert.

b) Wärmeabradat

Die in Wärme abradieren Epithelstückchen wurden in einen mit 1,5 ml eiskalter 0,5 n HClO_4 gefüllten Glas-in-Glas-Homogenisator nach POTTER-ELVEJHEM (Firma Kobe, Marburg), welcher zusammen mit der Perchlorsäure im System als Leergewicht vorgewogen war, hineingeworfen und erneut gewogen. Aus der Differenz der

beiden Meßwerte konnte direkt das Gewicht des Epithels bestimmt werden. Das sich im Homogenisator befindende Gewebe wurde nun im Eisbad etwa 2 Minuten homogenisiert, das entstandene milchig-trübe Homogenisat in Hostalenzentrifugenröhrchen überführt und etwa 7 Minuten lang bei 20.000 g in einer Laborzentrifuge mit Hochgeschwindigkeitsaufsatz (Firma Martin Christ, Osterode/Harz, Typ 'Christ Universal Junior III') bei dauernder Kühlung durch CO₂-Schnee zentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Gewebe trotz der hohen Geschwindigkeit nur auf maximal +4° C erwärmt. Den klaren Überstand füllten wir in einen eisgekühlten Meßzylinder, der Rückstand wurde mit 0,3 bis 0,5 ml 0,5 n HClO₄ nachextrahiert und dieser Überstand ebenfalls in den Meßzylinder überführt. Nach Ablesen des Extraktvolumens erfolgte die Neutralisation mit 10 n KOH auf p_H 6,0 bis 6,5. Die Neutralisation geschah wiederum im Eisbad. Der jeweilige p_H-Wert wurde durch zerstückeltes Spezialindikatorpapier Merck auf einer Tüpfelplatte bestimmt. Nach Abzentrifugieren des ausgefallenen KClO₄-Salzes wurde der fertige Extrakt in vorgekühlten Extraktgläschen bis zum Ende der Messungen im Eiskasten gehalten.

c) Epithelien nach Frierstop

Das unter flüssigem Stickstoff abradierte Epithel konnte nicht direkt in den Homogenisa-

tor nach POTTER-ELVEJHEM überführt werden, da viele der feinen Epithelstückchen an den Wänden des sehr engen Gefäßes haften geblieben und aufgetaut wären, ohne in die Perchlorsäure zu gelangen. Daher überführten wir die Stückchen nach Abdampfen des flüssigen Stickstoffs zunächst in ein im Eisbad stehendes weites Becherglas, in welches vorher 1,3 bis 1,5 ml 0,5 n eiskalter HClO_4 pipettiert worden war. Von dort wurden Epithelstückchen und Perchlorsäure in den vorgekühlten Homogenisator überführt und homogenisiert. Zentrifugierung, Nachextrakt, Neutralisation und Lagerung wurden wie unter Kapitel III, 4 b vorgenommen.

Die Zeitdauer bis zur Extrakterstellung ist erwartungsgemäß sehr variabel. Während die Extraktion aus Wärmeabradat nach 3/4 bis 1 Stunde beendet war, ist bei der Herstellung des Extraktes nach Frierstop und Abrasio unter flüssigem Stickstoff eine Zeitdauer von 1 1/2 Stunden anzunehmen. Die Extraktion der Metabolite aus dem Stroma entspricht in ihrer zeitlichen Länge etwa der aus dem Wärmeabradat.

5. Bestimmung der Metabolite im Extrakt und ihre

Bedeutung

Zur Bestimmung der Metabolitkonzentration wandten wir den optischen Test nach WARBURG an. Wir bedienten uns der Endwertmethode, d.h. wir registrierten den Ablauf bis zum vollständigen Umsatz der zu messenden Metabolite.

Der Nachstart mit einer genau angegebenen Menge Substrat nach Beendigung der Bestimmungen ist eine gute Kontrolle dafür, daß der Test funktioniert hat, und gleichzeitig eine Sicherheit dafür, daß nicht andere Faktoren als die zu testenden Substrate limitierend geworden sind.

Auch Prüfung der Proportionalität und Reproduzierbarkeit erfolgen am einfachsten auf diese Weise (HOHORST, KREUTZ und BÜCHER).

Die Testansätze, nach HOHORST, KREUTZ und BÜCHER gering modifiziert, lauteten im einzelnen:

A. L(-)-Malat, L(-)-Glycerin-1-phosphat und L(+)-Lactat

Der kombinierte enzymatische Test beruht auf folgenden

a)

Reaktionen

1. Malat + DPN^+ + Hydrazin $\xrightleftharpoons{\text{MDH}}$ OAA-Hydrazon + DPNH + H_3O^+
2. Glycerin-1-P + DPN^+ + Hydrazin $\xrightleftharpoons{\text{GDH}}$ DAP-Hydrazon + DPNH + H_3O^+
3. Lactat + DPN^+ + Hydrazin $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ Pyruvat-Hydrazon + DPNH + H_3O^+

b)

Reagentien

1. Hydrazin-Glykokoll-Puffer: 0,4 M Hydrazin-Sulfat, 1 M Glykokoll, 5 mM EDTA, mit NaOH auf p_H 9,5 eingestellt.
2. LDH: Lactatdehydrogenase (Boehringer) wurde 1:2 in aqua bidest. gelöst.
3. DPN-Lösung: 40 mg DPN (DPN Boehringer reinst) in 1 ml aqua bidest. gelöst.
4. MDH: Malatdehydrogenase (Boehringer) 1:4 in aqua bidest. verdünnt.
5. GDH: Glyzerin-1-Phosphatdehydrogenase (Boehringer) 1:4 in aqua bidest. verdünnt.

c)

Testzusammensetzung⁺

Im folgenden wird in den Testzusammensetzungen stets nach der Reihenfolge

1. Stroma
2. Wärmeabradat
3. normales Epithel nach Frierstop
4. regenerierendes Epithel nach Frierstop
5. Epithel nach Vereisung

vorgegangen.

1. 1,0 ml Extrakt
0,9 ml Hydrazinpuffer
0,1 ml DPN, 40 mg/ml

Start: 0,01 ml MDH 1:4

Start: 0,01 ml GDH 1:4

Start: 0,01 ml LDH 1:2

⁺Zur Testzusammensetzung ist zu bemerken, daß die Menge des Extraktes im Test in der laufenden Versuchsreihe häufig um 0,1 bis 0,2 ml schwanken kann, da sie u.a. auch von der am Ende der Messung noch vorhandenen Menge an Extraktvolumen abhängt. Selbstverständlich ist das in der endgültigen Testzusammensetzung stets berücksichtigt worden.

Die Messung erfolgt im registrierenden
Vitatron Universal Photometer UFD, $E = 334 \text{ m}\mu$
(Firma Vitatron, Holland)
 $d = 4$, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000.

2. 0,3 ml Extrakt
0,2 ml aqua bidest.
0,45 ml Hydrazinpuffer
0,05 DPN 40 mg/ml

Start: s. S. 26

3. entfällt

4.u.5. 0,2 ml Extrakt
0,3 ml aqua bidest.
0,45 ml Hydrazinpuffer
0,05 ml DPN 40 mg/ml

Start: s. S. 26

Die Messung erfolgt im registrierenden
Eppendorf Photometer $E = 366 \text{ m}\mu$ (Firma Netheler
& Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel)
 $d = 2$, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 0,250,
Spreizung beim Lactatatest 0 - 1,000, 25° C .

Wir verfolgten die Kinetik 6 bis 10 Minuten
und starteten mit dem neuen Enzym, wenn die
Reaktion ihren Endwert erreicht hatte.

Die Berechnung der Metabolitkonzentration wird nach folgender Formel ausgeführt:

1. Photometer Eppendorf:

$$\frac{\text{Mol}}{\text{g/frisch}} = \frac{\Delta_{366}^E \cdot \text{Testvolumen} \cdot \text{Extraktvolumen}}{\epsilon \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen} \cdot \text{Gewebsgewicht}}$$

Der Extinktionskoeffizient DPN/DPNH =
 $3,3 \cdot 10^6$ für $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ und $T = 25^\circ \text{ C}$
 (nach HOHORST)

$$F = \frac{\text{Extraktvolumen}}{\text{Gewebsgewicht}}$$

d = Schichtdicke

$$\frac{\text{Mol}}{\text{g/frisch}} = \frac{\Delta_{366}^E \cdot \text{Testvolumen} \cdot F}{3,3 \cdot 10^6 \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen}}$$

2. Photometer Vitatron

$$\frac{\text{Mol}}{\text{g/frisch}} = \frac{\Delta_{334}^E \cdot \text{Testvolumen} \cdot \text{Extraktvolumen}}{\epsilon \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen} \cdot \text{Gewebsgewicht}}$$

Der Extinktionskoeffizient DPN/DPNH =
 $6,08 \cdot 10^6$ für $\lambda = 334 \text{ m}\mu$ und $T = 25^\circ \text{ C}$

$$F = \frac{\text{Extraktvolumen}}{\text{Gewebsgewicht}}$$

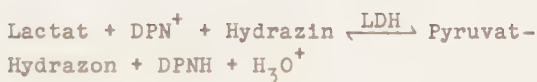
d = Schichtdicke

$$\frac{\text{Mol} \quad \Delta_{534}^E \cdot \text{Testvolumen} \cdot F}{\text{g/frisch} \quad 6,08 \cdot 10^6 \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen}} =$$

B. L(+)-Lactat

a)

Reaktion



b)

Reagentien

1. Hydrazinpuffer (s. S. 25)
2. aqua bidest.
3. DPN-Lösung (s.S. 25)
4. LDH-Lösung: LDH (Boehringer) wurde mit aqua bidest. verdünnt

c)

Testzusammensetzung

1., 2., 3.

und 4. 0,1 ml Extrakt

0,4 ml aqua bidest.

0,45 ml Hydrazinpuffer

0,05 ml DPN 40 mg/ml

Start: 0,02 ml LDH 1:2

Messung im registrierenden Eppendorf Photo-
meter $\epsilon = 366 \text{ m}\mu$

d = 2, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000
bzw. 0 - 0,500, 25° C

5. 0,2 ml Extrakt

0,3 ml aqua bidest.

0,45 ml Hydrazinpuffer

0,05 ml DPN 40 mg/ml

Start: 0,02 ml LDH 1:2

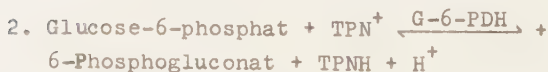
Messung im registrierenden Vitatron Photo-
meter $\epsilon = 334 \text{ m}\mu$

d = 2, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000,
 25° C

C. Adenosintriphosphat, Glucose-6-phosphat

a)

Reaktion



b)

Reagentien

1. Triäthanol-amin/HCl-Puffer (TRAP),
100 mMol, Äthylendiaminotetraessig-
säure (EDTA), 1 mMol, p_H 7,6
2. $MgCl_2$, 0,1 M
3. TPN-Lösung: 20 mg TPN (TPN-Boehringer)
in 1 ml aqua bidest. gelöst
4. Zwischenferment (Boehringer) 1:20 in
aqua bidest. verdünnt
5. Glucose 10^{-1} M
6. Hexokinase (Boehringer) 1:10 in aqua bi-
dest. verdünnt

c)

Testzusammensetzung

- 1.u.4. 0,5 ml Extrakt
0,5 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
0,01 ml $MgCl_2$ 0,1 M
0,01 ml TPN 20 mg/ml

Start: 0,01 ml ZF 1:20

0,01 Glucose 0,1 M

Start: 0,01 ml HK 1:10

2. 0,3 ml Extrakt
0,7 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
0,01 ml MgCl_2 0,1 M
0,01 ml TPN 20 mg/ml
-

Start: s. S. 31

3. 0,2 ml Extrakt
0,8 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
0,01 ml MgCl_2 0,1 M
0,01 ml TPN 20 mg/ml
-

Start: s. S. 31

Messung im registrierenden Eppendorf Photo-
meter $\epsilon = 366 \text{ m}\mu$

d = 2, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 0,250,
25° C

5. 1,0 ml Extrakt
1,0 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
0,01 ml MgCl_2 0,1 M
0,01 ml TPN 20 mg/ml
-

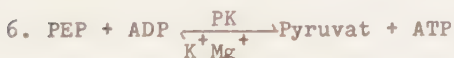
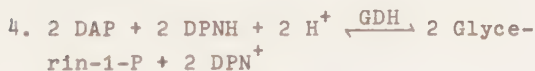
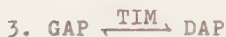
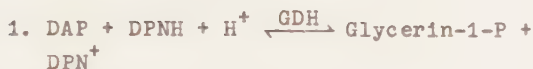
Start: s. S. 31

Messung im Vitatron Photometer $\epsilon = 334 \text{ m}\mu$
d = 4, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000,
25° C

D. Dihydroxyacetonphosphat, Fructosediphosphat, Pyruvat, Adenosindiphosphat, Adenosinmonophosphat

a)

Reaktion



b)

Reagentien

1. TRAP-EDTA-Puffer (s. S. 31)

2. DPNH (Boehringer) 8 mg/ml Puffer (in

TRAP-Puffer gelöst)

3. MgCl_2 0,1 M
4. GDH (Boehringer) 1:4 in aqua bidest.
verdünnt
5. Aldolase-Triosephosphatisomerase (ALD/
TIM) (Boehringer) 1:20 in aqua bidest.
verdünnt
6. LDH (Boehringer) 1:10 in aqua bidest.
verdünnt
7. PEP-Lösung: Cyclohexylammoniumsalz der
Phosphoenolsäure 15 mg in 1 ml aqua
bidest. gelöst
8. Pyruvatkinase (Boehringer) unverdünnt
9. Myokinase (Boehringer) 1:4 in aqua bi-
dest. verdünnt

c)

Testzusammensetzung

1. u. 4. 0,5 ml Extrakt
0,5 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
0,01 ml MgCl_2 0,1 M
0,01 ml DPNH 8 mg/ml
-

Start: 0,005 GDH 1:4

Start: 0,01 ALD-TIM 1:20

Start: 0,01 LDH 1:10

0,01 PEP 15 mg/ml

Start: Spur PK (Boehringer)

Start: 0,01 MK 1:4

2.u.3. 1,0 ml Extrakt

1,0 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol

Puffer p_H 7,6

0,015 ml $MgCl_2$ 0,1 m

0,01 ml DPNH 8 mg/ml

Start: s.o.

Messung im registrierenden Eppendorf Photo-
meter $E = 366 m\mu$

Bei 1. und 4. Schichtdicke $d = 2$, bei 2.
und 3. $d = 5$, Halbmikrokuvette, Spreizung
0 - 0,250, 25° C

5. 1,0 ml Extrakt

1,0 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol

Puffer p_H 7,6

0,015 ml MgCl_2 0,1 M
0,01 ml DPNH 8 mg/ml

Start: s. S. 35

Messung im registrierenden Vitatron-Photometer $\epsilon = 334 \text{ m}\mu$

d = 4, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000,
25° C

E. Glucose

a)

Reaktion



b)

Reagentien

1. TRAP-EDTA-Puffer (s. S. 31)

2. TPN-Lösung (s. S. 31)

3. MgCl_2 0,1 M

4. ZF 1:20 (s. S. 31)

5. HK 1:10 (s. S. 31)
6. ATP-Lösung: 80 mg ATP (Boehringer) in
1 ml aqua bidest. gelöst

c)

Testzusammensetzung

1. 0,1 ml Extrakt
- 0,85 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
- 0,015 ml TPN 20 mg/ml
- 0,01 ml $MgCl_2$ 0,1 M
- 0,005 ml ATP 80 mg/ml
- 0,01 ml ZF 1:20

Start: 0,01 HK 1:10

2., 3. und 4. entfällt

Messung im registrierenden Eppendorf Photo-
meter $\xi = 366 m\mu$

d = 2, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 0,250,
25° C

5. 0,5 ml Extrakt
- 0,5 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol
Puffer p_H 7,6
- 0,01 ml $MgCl_2$ 0,1 M
- 0,005 ml ATP 80 mg/ml
- 0,015 ml TPN 20 mg/ml

0,01 ml ZF 1:20

Start: s. S. 37

Messung im registrierenden Eppendorf-Photo-
meter $\epsilon = 366 \text{ m}\mu$

d = 2, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000,
25° C

bzw.

0,10 ml Extrakt

0,40 ml TRAP 100 mMol/EDTA 1 mMol

Puffer p_H 7,6

0,01 ml TPN 20 mg/ml

0,005 ml ATP 80 mg/ml

0,01 ml $MgCl_2$ 0,1 M

0,005 ml ZF 1:20

Start: s. S. 37

Messung im registrierenden Vitatron Photo-
meter $\epsilon = 334 \text{ m}\mu$

d = 1, Halbmikrokuvette, Spreizung 0 - 1,000,
25° C

6. Das Gewicht der Hornhaut

Die Wägung des zu untersuchenden Gewebes war insofern für uns wichtig, als die Größe der Metabolitgehalte immer auf g Frischgewicht bezogen wurde. Das wegen seines anhängenden Endothels etwas zu hoch liegende Stroma- und das Wärmeabradat des Epithels konnten direkt gewogen werden, während die Bestimmung des Hornhautepithels nach Frierstop wegen der sehr starken Wasseradsorption unmöglich war. Wir konnten nur den trockenen Rückstand im Zentrifugenglas in Reihenuntersuchungen bestimmen, die Standardabweichung vom Mittelwert feststellen und versuchen, eine Beziehung zwischen Feuchtgewicht und trockenem Rückstand zu finden. Es ergab sich eine Relation von 3,15.

Feuchtgewicht ermittelt durch Wärmeabradat	getrockneter Rückstand	Relation Feuchtge- wicht getrockneter Rückstand	Relation in % Wasserge- halt
5,45 $\pm$ 0,27 n = 25	1,73 $\pm$ 0,09 n = 36	3,15	68,2 %

Tab. 5:

Beziehung zwischen Feuchtgewicht des Hornhaut-epithels und Gewicht des getrockneten Rückstandes nach Extraktion mit Perchlorsäure beim Kaninchen.

Dimension: mg, $M \pm S_M$

Gleichzeitig konnte durch Umrechnung in % auch der Wassergehalt bestimmt werden.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, daß beim Abkratzen immer ein Teil des Epithels verloren ging, jedoch reichen die angegebenen Gewichtsgrößen aus, um sie als Relation zwischen Feucht- und Trockengewicht und für die Ermittlung des Wassergehaltes zu verwenden. Außerdem stimmen die Werte gut mit den von FRENCH und DUMA angegebenen überein, wobei es uns jedoch nicht möglich war, das Endothel quantitativ zu erfassen.

	REIM, LICHTE, diese Arbeit	FRENCH, DUMA n = 10
ganze Hornhaut	81,5	70,6
Epithel	5,45 $\pm$ 0,27 n = 25	5,65
Stroma	76,00 $\pm$ 3,50	61,5
Endothel	n = 15	3,35

Tab. 6:

Frischgewicht der Kaninchenhornhaut.

Dimension: mg

Wie angegeben, berechnet sich aus dem Quotienten von Extraktvolumen und Feuchtgewicht

des Gewebes der Faktor, der beim Stroma zwischen 20 und 70, beim Wärmeabradat und Frier-stop-Epithel zwischen 100 und 200, beim vereisten und regenerierenden Epithel zwischen 200 und 300 lag.

7. Statistik

Die statistische Auswertung:

Der statistischen Beurteilung der gefundenen Versuchsergebnisse liegt zugrunde, daß alle Messungen unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt werden.

Die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und der Abweichung des Mittelwertes erfolgte nach den Formeln (GEIGY-Tabellen, 5. Auflage 1955):

I. Summe der Einzelwerte

$$\Sigma x = \Sigma x$$

II. Summe der Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert

$$\Sigma (x - \bar{x})$$

III. Summe der Abweichungen im Quadrat

$$\Sigma (x - \bar{x})^2$$

IV. Summe der Einzelwerte im Quadrat

$$\Sigma x^2$$

Der Mittelwert:

$$\bar{M} = \Sigma x : n$$

(n = Anzahl der Einzelwerte)

Die Streuung beträgt:

$$s^2 = \frac{\Sigma x^2 - \bar{M} \cdot \Sigma x}{n - 1}$$

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Quadratwurzel der Streuung

$$s = \sqrt{\frac{S(x^2) - M \cdot S(x)}{n - 1}}$$

Die Streuung des Mittelwertes der Stichproben wird bestimmt nach

$$S_M^2 = \frac{1}{n} S^2$$

und die Standardabweichung der Mittelwerte nach

$$S_M = \frac{1}{\sqrt{n}} S$$

IV. E r g e b n i s s e

1. Die Metabolitgehalte des Hornhautstromas

in vivo

Die Metabolitgehalte des Hornhautstromas sind in Tab. 7 als Mittelwerte aufgeführt und in Abb. 3 als Metabolitmuster graphisch dargestellt. Die Einzelmessungen zeigt Tab. 1 des methodischen Anhangs. Die Standardabweichungen der Mittelwerte liegen zwischen 5 und 10 %.

Lactat und Glucose weisen die höchsten Werte auf, da sie, wie das Pyruvat, intra- sowie extrazellulär vorkommen. Im Stroma ist der extrazelluläre Raum bedeutend und daher liegen auch die Gehalte der nur intrazellulär vorkommenden Metabolite ATP, ADP, AMP, Malat, α -GP, DAP, G-6-P und FDP um 1 bis 2 Größenordnungen unter dem des Lactats.

2. Die Metabolitgehalte des in situ abradierten

Hornhautepithels des Kaninchens

In Abb. 4 sind die Metabolite des in situ abradierten Epithels graphisch dargestellt.

In Tab. 8 finden sich die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Mittelwerte, die diesmal mit 5 bis 20 % höher als im Stroma sind. Tab. 2 im methodischen Anhang gibt die gemessenen Einzelwerte wieder. Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß die Größenordnung der Ordinate in Abb. 4 um eine Zehnerpotenz höher liegt als in Abb. 3. Während also, allgemein ausgedrückt, die Metabolitgehalte im abradierten Epithel gegenüber dem Stromawert um das acht- bis zehnfache zugenommen haben, trifft dieses für einige Substrate bei weitem nicht zu, der Lactatwert stieg nämlich nur auf das vierfache, die Glucose war sogar gegenüber dem Stroma vermindert, Abweichungen zur entgegengesetzten Seite zeigte das FDP, das auf das 25-fache gegenüber dem Stromawert anstieg. Der interessanteste Befund scheint für unsere Betrachtung der überraschend niedrige ATP/ADP-Quotient zu sein. REIM und LICHTÉ (s. Kapitel V) haben für die Gesamthornhaut einen Wert von 4,8 ermittelt, im Stroma lag der Quotient nur bei 2,1. Auf Grund einer einfachen Überlegung kommt man zu dem Ergebnis, daß der ATP/ADP-Quotient bei dem geringen Gewebsanteil des Epithels an der Gesamthornhaut bei mindestens 9 liegen muß, um einen Quotientenanstieg in der Gesamthornhaut auf 4,8 zu erzielen. Auch die Summe der ATP-Werte von Epithel und Stroma, auf g Frischgewicht bezogen, liegt gegenüber den Befunden von REIM und LICHTÉ zu niedrig. Deshalb scheinen die gefundenen Werte wohl nützlich zu sein für die Betrachtung der Größenordnung der Metabolite im Epithel, jedoch

können sie kaum den in vivo zu erwartenden absoluten Gehalten nahekomen.

3. Die Metabolitgehalte eines normalen Epithels vom Kaninchen nach Frierstop

Die Tab. 9 gibt die Mittelwerte mit Standardabweichungen wieder, Tab. 3 im methodischen Anhang die Einzelwerte und die Abb. 5 das Metabolitmuster. Wir haben versucht, eine Alteration oder gar Zerstörung des Gewebes dadurch zu vermeiden, daß wir das Epithel in toto im Gewebsverband einfroren, ohne vorher, wie beim Wärmeabradat, durch Abrasio den Zellverband und damit den in vivo Status zu zerstören. Tatsächlich scheint besonders das Adenylphosphatsystem den von ihm postulierten Eigenschaften nahezukommen. Der ATP/ADP-Quotient, der nach BÜCHER ein wichtiger Indikator für das Energiepotential der Zelle ist und sehr empfindlich auf Gewebsalterationen mit einem Absinken reagiert, ist auf 12,2 angestiegen. Während einige Metabolite, wie das α -GP, DAP und Malat, kaum Veränderungen gegenüber dem Wärmeabradat zeigen, ist der Wert von Pyruvat und besonders von Lactat angestiegen. Weiter sei auf den Glucoseanstieg und den Abfall der FDP- und G-6-P-Gehalte hingewiesen. Das AMP als eine energiearme Stufe im Adenylphosphatsystem ist gegenüber dem Wärmeabradat ebenfalls deutlich zurückgegangen.

4. Die Metabolitgehalte eines regenerierenden
Epithels nach Abrasio in situ, nach Frierstop

Das Metabolitmuster ist in Abb. 6, die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen in Tab. 10 wiedergegeben. Tab. 4 im methodischen Anhang zeigt die Einzelergebnisse. Lactat, FDP und AMP zeigen Schwankungen von über 10 %. Wegen der geringen Menge an Extrakt konnten wichtige Metabolite wie G-6-P, Glucose sowie α -GP und DAP nicht bestimmt werden, es erschien uns wichtiger, Veränderungen im Adenylphosphatsystem zu prüfen. Wichtig für energetische Aussagen im regenerierenden Epithel scheinen der Anstieg des ATP/ADP-Quotienten auf 16,2 und das Anwachsen der ATP auf über 5.000 nMol/g Frischgewicht zu sein. Die Summe der Adenosinphosphate beträgt über 6.000 nMol/g Frischgewicht.

5. Die Metabolitgehalte eines eingefrorenen und
wiederaufgetauten Epithels in vivo. Präpara-
tion nach Frierstop

Das Metabolitmuster ist auf Abb. 7 nach den Mittelwerten der Tab. 11 und den Einzelwerten der Tab. 5 im methodischen Anhang dargestellt. Wieder ist die Standardabweichung von Lactat mit über 15 % relativ hoch, während sich die Schwankungen der anderen Meta-

bolite unter 10 % halten. Der ATP/ADP-Quotient liegt mit 0,9 sehr niedrig, der Anteil des AMP an den Gesamtadenosinphosphaten beträgt mit 1.752 nMol/g Frischgewicht mehr als 50 %. Auch diesmal war es aus Gründen des Extraktmangels nicht möglich, durchschnittlich mehr als 6 Metabolite zu messen, wobei der Schwerpunkt der Betrachtungsweise diesmal wieder auf der Bestimmung der Adenosinphosphate liegt.

6. Veränderungen der Metabolitgehalte eines eingefrorenen und wiederaufgetauten Epithels in der Zeit nach dem Wiederauftauen

Als letztes kommt es uns darauf an zu prüfen, wie sich das Hornhautepithel nach Einfrieren verhält, ob es sich 'erholt' und ob es zu einer restitutio ad integrum kommt. Zu diesem Zweck vereisen wir die Hornhaut in leichter Narkose in situ und töten die Tiere nach zunehmenden Zeitabständen, um zu prüfen, ob sich die durch tiefe Temperaturen gesetzten Schäden nach Stunden, Tagen oder Wochen zurückbilden können. Dabei beobachteten wir fortlaufend die Veränderungen an der Hornhaut, soweit sie sich makroskopisch feststellen ließen. Nach Vereisung wird die Hornhaut sofort wieder völlig klar, dann stellt sich jedoch im Laufe von Stunden eine leichte Trübung ein,

die zunehmend diffuser und massiver wird, nach etwa 20 Stunden ein Maximum erreicht und sich dann in den nächsten 20 bis 40 Stunden zu einer zarten Trübung zurückbildet, bis die Hornhaut nach etwa 80 Stunden ihre alte Klarheit wiedererhalten hat. Nach jeweils 0,5, 3,5, 15,5, 44,0, 55,0, 62,0, 67,0 und 90,0 Stunden töteten wir die Tiere und bestimmten nach Frierstop die Gehalte der einzelnen Metabolite.

Tab. 6 des methodischen Anhangs gibt die Einzelergebnisse wieder. In Abb. 6 sind die Veränderungen im Adenosinphosphatsystem dargestellt. Der ATP-Gehalt sinkt in den ersten Minuten stark ab, erreicht schon nach 30 Minuten ein Minimum, um dann langsam wieder anzusteigen. Charakteristisch ist dabei, daß nach 50 bis 70 Stunden ein steiler Anstieg zu verzeichnen ist, nach 80 Stunden hat der ATP-Wert seine ursprüngliche Höhe wiedererreicht. Mit dem ATP-Abfall sinkt auch die Summe der Adenosinphosphate ab, die etwas langsamer als die ATP wieder zu ihrem Ausgangspunkt zurückkehrt. Der Abfall der $\sum AP$ ist auch nicht so abrupt wie der bei der ATP, da ein Absinken der ATP immer ein gleichzeitiges Ansteigen von ADP und AMP zur Folge hat. Die Gehalte von ADP und AMP zeigen innerhalb der ersten Stunde einen Maximalwert, ADP fällt dann zunächst ab, um nach etwa 50 Stunden ein weiteres Maximum zu erreichen. Der allmähliche Abfall von AMP verläuft unruhig. Die Veränderung des ATP/ADP-Quotienten in Abb. 7 und 8 äußert sich zunächst

in einem starken Abfall des Wertes, dann bleibt der Quotient bis zu etwa 45 Stunden nach dem Einfrieren konstant niedrig, um dann innerhalb der nächsten 25 Stunden steil auf über 12 anzusteigen.

Der FDP-Wert verändert sich zunächst nicht sehr deutlich, es setzt sich jedoch nach etwa 45 Stunden, also zu dem Zeitpunkt, da sich auch das ATP und der ATP/ADP-Quotient stark verändern, ein plötzlicher Anstieg ein, der Wert steigt innerhalb weniger Stunden auf das Doppelte, fällt dann ziemlich rasch, später jedoch verzögerter ab und erreicht nach ungefähr 90 Stunden seinen Ausgangswert.

Anhang zu Kapitel IV

(Tab. 7 bis Tab. 11 und Abb. 3 bis Abb. 10)

Metabolit	n	M	S_M	Vergleichs- werte der Literatur
Lactat	15	7058	2110	8560 1)
Pyruvat	15	244	22	
L/P	15	29	1,78	
α -GP	4	48	5	
DAP	5	23,7	7	
G/D	1	4,7		
Malat	4	68	5	
G-6-P	2	37,8	10,8	
FDP	9	15	2	
Glucose	14	3061	192	
ATP	15	103	7,9	147 2) 86 3)
ADP	15	57	6,7	
ATP/ADP	15	2,1	0,19	
AMP	15	183	37,8	
Σ AP	15	341	45	
AdK	15	0,228	0,047	

1) MORLEY und TOTH

2) HERRMANN und HICKMAN

3) HERRMANN und LEBEAU

Tab. 7:

Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels im Hornhautstroma mit anhängendem Endothel vom Kaninchen in vivo.

Mittelwerte M und Standardabweichung der Mittelwerte S_M in nMol/g Frischgewicht

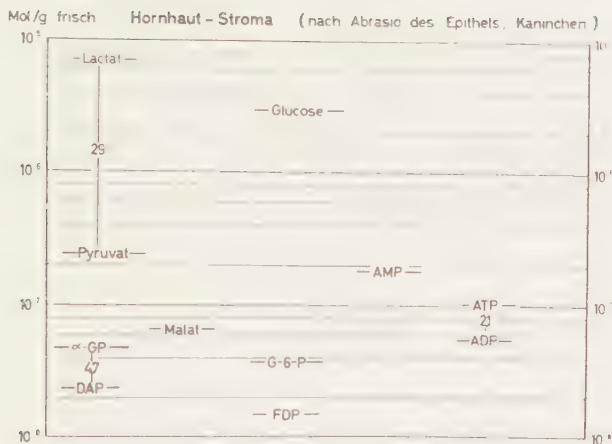


Abb. 3:

Metabolitmuster des Hornhautstromas vom Kaninchen.

Darstellung der Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels des Hornhautstromas im halb-logarithmischen System analog zum Enzymverteilungsmuster. Ordinate logarithmisch.

Anstelle der absoluten Werte der Metabolite in Mol/g Frischgewicht sind die Namen der Metabolite in symbolhaften Abkürzungen eingetragen. Reaktionssysteme stehen senkrecht übereinander und sind durch Linien verbunden, in denen die Zahlen die Quotienten der Gehalte der Reaktionspartner wiedergeben.

Die Werte sind der Tab. 7 entnommen.

Metabolit	n	M	S _M	Vergleichs- werte der Literatur
Lactat	11	27194	4660	11000 1)
Pyruvat	11	1130	195	
L/P	11	26,8	2,92	
α-GP	9	641	65,5	
DAP	9	153	23,1	
G/D	9	4,78	0,68	
Malat	99	634	67,23	
G-6-P	7	224	18,25	
FDP	11	384	75,85	
Glucose	8	2261	401	
ATP	11	1910	255,72	1425 2) 2200 3)
ADP	11	1468	133,38	
ATP/ADP	11	1,37	0,221	
AMP	11	1605	247,3	
Σ AP	11	4983	263,4	
AdK	11	0,87	0,089	

1) MORLEY und TOTH

2) HERRMANN und HICKMAN

3) HERRMANN und LEBEAU

Tab. 8:

Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels im in situ abradierten Hornhautepithel des Kaninchens.

Dimension: nMol/g Feuchtgewicht

Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte ($M \pm S_M$)

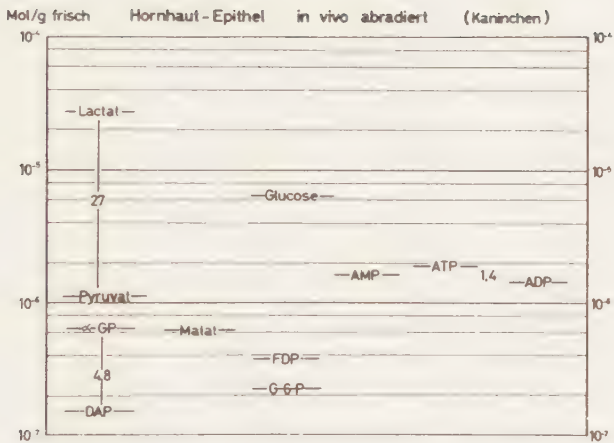


Abb. 4:

Metabolitmuster in vivo abradierten Hornhaut-epithels analog zu Abb. 3, jedoch hat sich die Größenordnung der halblogarithmischen Ordinate verändert.

Die Werte sind der Tab. 8 entnommen.

Metabolit	n	M	S _M	Vergleichs- werte der Literatur
Lactat	13	52790	8190	11000 1)
Pyruvat	14	1221	109	
L/P	13	42	6	
α-GP	7	578	7,2	
DAP	7	127	14	
G/D	4	4,7	0,3	
Malat	6	710	103	
G-6-P	5	157	1,4	
FDP	8	180	50	
Glucose	3	4668	452	
ATP	14	3032	132	1425 2) 2200 3)
ADP	14	264	21	
ATP/ADP	14	12,2	0,91	
AMP	14	926	76	
Σ AP	14	4213	154	
AdK	14	0,03	0,007	

1) MORLEY und TOTH

2) HERRMANN und HICKMAN

3) HERRMANN und LEBEAU

Tab. 9:

Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel des Kaninchens, dem in vivo Zustand angenähert (Frierstopverfahren).

Mittelwerte und Standardabweichung der Mittelwerte ($M \pm S_M$) in nMol/g Frischgewicht

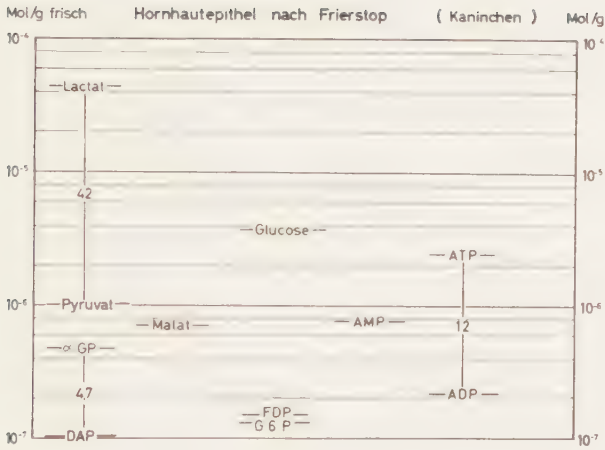


Abb. 5:

Metabolitmuster analog zu Abb. 3 vom Hornhaut-
epithel des Kaninchens, dem *in vivo* Status an-
genähert. Präparation unter Anwendung des Frier-
stopverfahrens.

Nach Werten der Tab. 9.

Metabolit	n	M	S _M
Lactat	6	63000	10789
Pyruvat	7	1542	126
L/P	6	38,6	4,332
FDP	6	202	36,6
ATP	7	5029	450,9
ADP	7	316	36,6
ATP/ADP	7	16,2	0,8854
AMP	7	1082	177,6
Σ AP	7	6426	614
AdK	7	0,021	0,003

Tab. 10:

Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels im regenerierenden Hornhautepithel beim Kaninchen nach Abrasio in vivo.

Mittelwerte und Standardabweichung der Mittelwerte ($M \pm S_M$) in nMol/g Frischgewicht

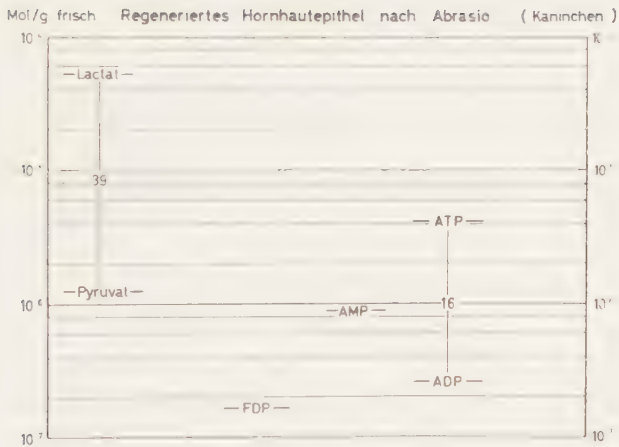


Abb. 6:

Metabolitmuster eines regenerierenden Hornhautepithels des Kaninchens nach vorheriger Abrasio in vivo analog zur Abb. 3. Präparation wieder unter Anwendung des Frierstopverfahrens.

Metabolit	n	M	S _M
Lactat	6	53239	8562
Pyruvat	7	1573	158
L/P	6	33	6
α-GP	3	440	-
Malat	4	565	57
FDP	4	104	10
ATP	7	710	72
ADP	6	741	69
ATP/ADP	6	0,90	0,044
AMP	6	1752	166
Σ AP	6	3164	270
AdK	6	0,506	0,092

Tab. 11:

Metabolitgehalte des Energie liefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel des Kaninchens nach kurzem Vereisen und Wiederauftauen *in vivo*.

Mittelwerte und Standardabweichung der Mittelwerte ($M \pm S_M$) in nMol/g Frischgewicht

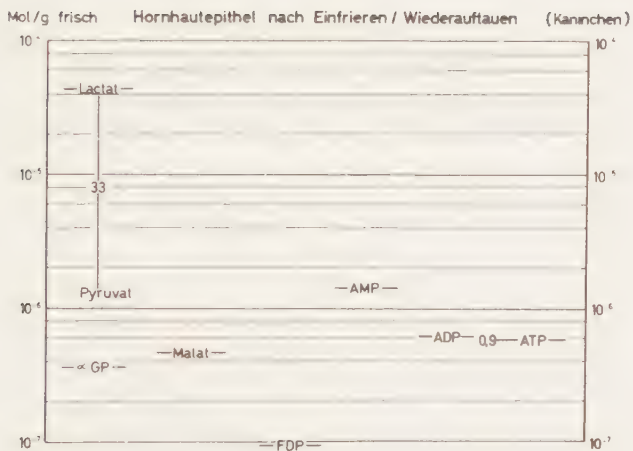


Abb. 7:

Metabolitmuster des Hornhautepithels beim Kaninchen nach kurzem Vereisen und Wiederauftauen in vivo und anschließendem Frier-stop.

In Analogie zu Abb. 3.

Werte nach Tab. 11.

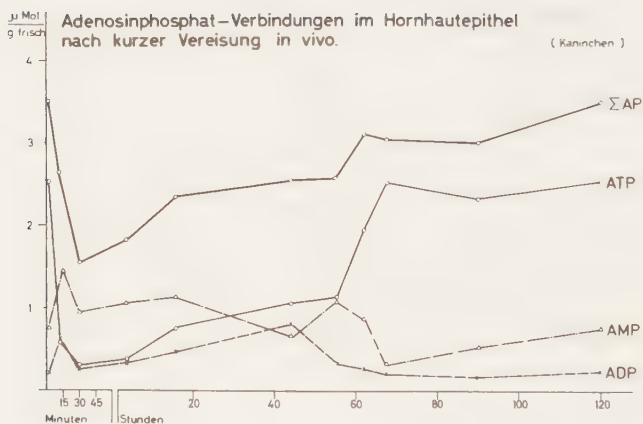


Abb. 8:

Zeitlicher Ablauf der Veränderung von ATP, ADP, AMP und die Zunahme der Adenosinphosphate (Σ AP) im Hornhautepithel vom Kaninchen nach kurzem Einfrieren und Wiederauftauen in vivo.

Ordinate: Metabolitgehalt in μ Mol/g Frischgewicht.

ATP —————
 ADP - - - - -
 AMP - - - - -
 Σ AP —————

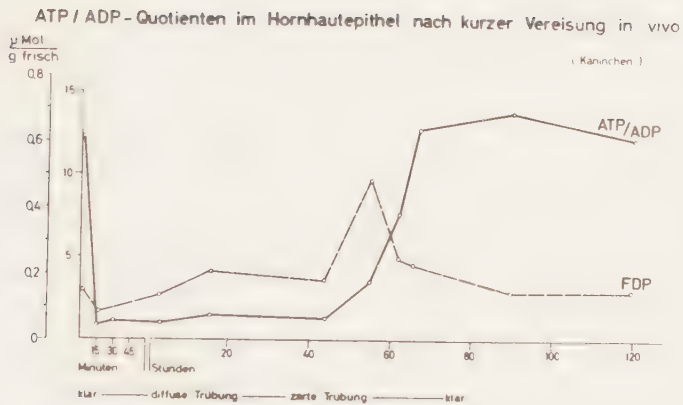


Abb. 9:

Zeitlicher Ablauf der Veränderung des ATP/ADP-Quotienten und des FDP-Gehaltes im Hornhautepithel vom Kaninchen.

Ordinaten: 1. FDP-Gehalt in $\mu\text{Mol/g Frischgewicht}$
 2. ATP/ADP-Quotient

Abszisse: Zeit nach Vereisung

ATP / ADP-Quotienten im Hornhautepithel nach kurzer Vereisung in vivo.

(Kaninchen)

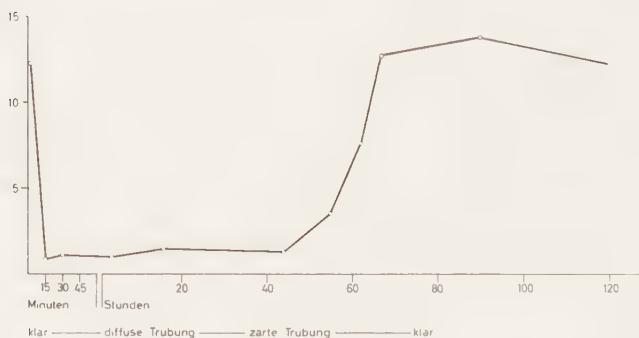


Abb. 10:

Zeitlicher Ablauf der Veränderung des ATP/ADP-Quotienten.

Ordinate: ATP/ADP-Quotient

Abszisse: Zeit nach Vereisung

V. D i s k u s s i o n

Metabolit	n	M	S _M	Vergleichs- werte der Literatur
Lactat	14	7644,0	301,0	8560 1)
Pyruvat	15	278,0	7,5	
L/P	15	29,5	1,1	
α-GP	13	64,8	5,5	
DAP	5	15,4	4,4	
G/D	4	4,0	1,6	
Malat	12	60,0	4,2	
G-6-P	7	34,6	5,4	
FDP	14	8,7	1,1	
Glucose	12	3732,0	214,5	4650 2)
ATP	16	418,0	22,5	Rind 225 3) Schwein 169 4)
ADP	16	88,9	6,2	Rind 163 3) Schwein 79 4)
ATP/ADP	16	4,8	0,2	Rind 1,38 3) Schwein 2,13 4)
AMP	15	316,9	27,8	Rind 150 3) Schwein 58 4)
Σ AP	15	826,4	58,9	Rind 538 3) Schwein 306 4)

1) MORLEY und TOTH

2) WEEKERS

3) SÖLLNER

4) SÖLLNER und HOCKWIN

Tab. 12:

Metabolitgehalte der normalen Hornhaut (Gesamthornhaut) des Kaninchens in vivo.

$M \pm S_M$, Dimension in n Mol/g Frischgewicht
nach REIM und LICHT

In Tab. 12 sind die Mittelwerte der Metabolitgehalte der gesamten Cornea sowie ihre Standardabweichungen dargestellt. Es handelt sich um elf Metabolite des Energie liefernden Stoffwechsels, die im enzymatisch-optischen Test ermittelt wurden. Nur die Bestimmung möglichst vieler Metabolite in verschiedenen Funktionszuständen kann Aufschluß über die Mechanismen der Energiebildung und des Energieverbrauchs in der 'chemischen Fabrik Zelle' geben. Wie aus Vergleichswerten mit der Literatur, besonders bei SÖLLNER und HOCKWIN, zu ersehen ist, liegen die gefundenen Werte dieser Autoren, wohl hauptsächlich wegen der von ihnen angewandten Präparationsmethode, oft erheblich unter denen, die mit dem enzymatisch-optischen Test ermittelt wurden. Wir haben versucht, die von REIM und LICHTÉ gefundenen Werte der Gesamthornhaut je nach Gewebsart weiter zu differenzieren. Dabei schien es uns vor allem wichtig, die Metabolitgehalte im zellreichen Epithel und dem bindegewebsähnlichen Hornhautstroma unabhängig voneinander zu bestimmen. Es war uns nicht möglich, die einzellige Endothelschicht vom Stroma abzutrennen. Deshalb liegen die gefundenen Werte für das Stroma insgesamt etwas zu hoch. Schließlich wurde versucht, die Veränderung der Epithelmetabolite nach verschiedenen, künstlich verursachten Gewebsalterationen zu erfassen.

Eine quantitative Gegenüberstellung der Metabolitgrößenordnungen vom Epithel nach Frierstop und vom Stroma zeigt, daß die Werte im Epithel bei weitem höher liegen als im Stroma. So ist die Lactatkonzentration im Frierstop-Epithel um über das Siebenfache höher als im Stroma, ähnlich ist das Verhältnis beim Pyruvat und DAP, für Malat und FDP liegt das Verhältnis noch höher, während es für G-6-P etwas tiefer liegt. Die ^{vorwiegend} extrazellulär liegende Glucose ist im Epithel kaum gegenüber dem Stromawert erhöht. Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal zeigen die Adenosinphosphate: der ATP-Gehalt ist im Epithel 3mal so hoch wie im Stroma, die Relationen von AMP und Σ AP liegen zwar etwas niedriger, sind aber immer noch beträchtlich. Weil der von REIM und LICHTHE angegebene ATP/ADP-Quotient für die Gesamthornhaut 4,8 beträgt und sich als Mischquotient aus der Interferenz der Werte für Epithel und Stroma zusammensetzt, war anzunehmen, daß sich das zellarme Stromagewebe in einem energieärmeren Status befinden würde als das zellreiche Epithel. Tatsächlich liegt der ATP/ADP-Quotient im Epithel etwa 6mal so hoch wie im Stroma. An sich liegen auch die Werte für die sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommenden Metabolite Lactat und Pyruvat ebenso wie der L/P-Quotient im Hornhautepithel erstaunlich hoch, jedoch fand auch LANGHAM durch manometrische Messung der Lactatproduktion im Epithel der Kaninchenhornhaut, die in glucosehaltigem Medium (Krebs-Ringer-Lösung)

gelagert war, Werte von 1840 nMol/g Feuchtgewicht/min, die um das 26-fache höher lagen als die von ihm gleichzeitig gemessenen Stromawerte. Die ebenfalls von LANGHAM gemessene Lactatproduktion im Endothel lag mit 1300 nMol/g Feuchtgewicht/min in der Größenordnung der gemessenen Epithelwerte. Es dürfte sich hier um die bereits vor 40 Jahren von MEYERHOFF entdeckte aerobe Glykolyse des Corneaepithels handeln. Die von HERRMANN und HICKMAN sowie HERRMANN und LEBEAU ermittelten ATP-Werte für Epithel und Stroma stimmen gut mit unseren Ergebnissen überein. Es liegen in der Hornhaut also ein stoffwechselaktives, zellreiches und ein an Bindegewebe erinnerndes, faserreiches, aber zell- und stoffwechselarmes Gewebe unmittelbar nebeneinander.

Das Ziel unserer methodischen Maßnahme sollte es sein, dasjenige Metabolitmuster für das Hornhautepithel aufzustellen, das dem in vivo Status des Gewebes möglichst nahe kommt. Ein sehr wichtiger Hinweis darauf schien uns die Höhe des ATP/ADP-Quotienten zu sein, da dieser sehr empfindlich auf Gewebsalterationen reagiert. Dieser Quotient ist beim in Wärme abradierten Epithel sehr niedrig. Offensichtlich ist die Aktivität der AdK in der Lage, den Abfall der ATP von ihrem hohen energetischen Niveau und ihre Umwandlung in energieärmere Stufen des Adenosinphosphatsystems innerhalb von Sekunden durchzuführen. Die von REIM gemessene Aktivität

von $18,6 \mu \text{ Mol/g Feuchtgewicht/min}$ ist dafür ausreichend. Mit dem in Kapitel III beschriebenen Frierstopverfahren erreichten wir durch die Möglichkeit, den Epithelverband fast unbeschädigt einzufrieren und die Fähigkeit, ihn in flüssigem Stickstoff blitzschnell auf sehr tiefe Temperaturen zu bringen, eine sehr schnelle Fixierung des Gewebsstoffwechsels und Werte, die dem in vivo Status sehr nahe kommen, wie der gemessene Quotient von 12,2 zeigt. Dieser hohe Quotient spricht für ein hohes Energiepotential und damit für einen hochaktiven oxydativen Stoffwechsel. Im glykolisierenden Gewebe findet sich ein ATP/ADP-Quotient unter 2 (HOHORST, KREUTZ, REIM und HÜBENER). Beim Wärmeabradat scheint der Stoffwechsel eine Umstellung vom oxydativen auf den glykolytischen Abbau vorgenommen zu haben. Weiter finden wir beim Wärmeabradat einen Anstieg von FDP und G-6-P, während die Glucose gegenüber dem Frierstop-Epithel deutlich vermindert ist. Sie wird also abgebaut. Der Anstieg von FDP und G-6-P kann als ein Anstau verstanden werden, wobei sich die niedrige Aktivität der Aldolase im Sinne eines Ventil- oder Regulationsmechanismus limitierend auswirken könnte (REIM). HOHORST deutete den FDP-Anstieg als Zeichen einer stark einsetzenden Glykolyse. Er fand als erste Reaktion bei tetanischer Kontraktion einen erheblichen Anstieg von G-6-P und FDP. LA TESSA stellte an elektronenmikroskopischen Aufnahmen fest, daß im regenerierenden Epithel Größe und Zahl der Mitochondrien zunimmt. Da die Atmungskette und damit

die ATP-Produktion durch die oxydative Phosphorylierung (BÜCHER, KLINGENBERG) an das morphologische Substrat der Mitochondrien gebunden ist, könnten die regenerierenden Hornhautepithelzellen eine noch größere biochemische Aktivität als das normale Epithel aufweisen, da sehr viel Energie vor allem für synthetische Aufgaben vorhanden sein muß. In Abb. 1 b ist das mikroskopische Bild einer Cornea mit einer regenerierenden Epithelzellschicht zu sehen. Diese neugebildete Epitheldecke in der Hornhaut besteht aus höchstens zwei Basalzellschichten und einer ganz dünnen einzelligen Lage von Superfizialzellen. Es ist möglich, daß wir mit der Bestimmung der Metabolite im regenerierenden Epithel gleichzeitig ein dem Metabolitmuster der Basalzellen sehr nahekommendes Muster aufgestellt haben. Tatsächlich liegt der ATP/ADP-Quotient mit 16 und die Summe der Adenosinphosphate mit 6426 nMol/g Frischgewicht über den Werten des normalen Epithels. Es ist anzunehmen, daß die Zunahme der Mitochondrien und die Ansteigen der Adenosinphosphatsumme parallel verlaufen.

Die größte Alteration scheint das Epithelzellgewebe durch Einfrieren und Wiederauftauen zu erfahren. Dabei werden durch die Bildung von Eiskristallen die zelluläre und ultrazelluläre Ordnung zerstört (TANAKA, AONO). Da der normale Ablauf des Energiestoffwechsels jedoch an einen geregelten zellulären Aufbau gebunden ist, wird er durch die Zerstörung der äußeren und intrazel-

lulären Membranen und die damit verbundene Auflösung der einzelnen 'Zellräume' besonders schwer geschädigt. Vor allem die Adenosinphosphate zeigen ein ausgeprägtes 'Mißverhältnis', wie eine Gegenüberstellung mit dem normalen Frierstop-Epithel in Tab. 13 zeigt.

	normales Frier- stop-Epithel	Epithel nach Vereisung und Wiederauftauen
ATP	3032,0 $\pm$ 132,0	710,0 $\pm$ 72,0
ADP	264,0 $\pm$ 21,0	741,0 $\pm$ 69,0
AMP	926,0 $\pm$ 76,0	1752,0 $\pm$ 166,0
Σ AP	4213,0 $\pm$ 154,0	3164,0 $\pm$ 270,0
ATP/ADP	12,2 $\pm$ 0,9	0,9 $\pm$ 0,04

Tab. 13:

Gegenüberstellung der Adenosinphosphate eines dem in vivo Status angenäherten Frierstop-Epithels und einem Epithel nach Vereisung und Wiederauftauen.

$M \pm S_M$, Dimension in nMol/g Frischgewicht

Dabei ist der ATP/ADP-Quotient mit 0,9 noch unter den Wert des Wärmeabrades gesunken. Der Anteil der energiearmen Stufe AMP an den Gesamtadenosinphosphaten beträgt über 50 %. Auch die Summe der Adenosinphosphate ist deutlich vermindert. Es wäre möglich, daß ein Teil der intrazellulären Phosphate während des Einfrierens aus dem Epithelgewebe 'ausgepreßt' worden ist. In Abb. 11 sind noch einmal alle gemessenen ATP/ADP-Quotienten des Epithels nebeneinander aufgestellt und mit dem Stroma verglichen.

Wenn wir das Epithel nach Vereisen und Wiederauftauen zunehmend lange in situ lassen und dann nach Frierstop die Metabolite extrahieren, können wir die Wiederherstellung der alten Zellordnung verfolgen. Als Kriterium dient uns dabei wieder der ATP/ADP-Quotient. Nach etwa 40 Stunden läßt ein plötzlicher Anstieg von FDP das Einsetzen des Substratflusses erkennen. Dieser Anstieg liegt zeitlich kurz vor dem Ansteigen des ATP/ADP-Quotienten. Die Wiederherstellung des normalen Energiepotentials in der Hornhaut scheint etwa so lange zu dauern wie die Neubildung von Mitochondrien (LA TESSA). Es liegt nahe anzunehmen, daß die Unversehrtheit der Mitochondrien für den Energiehaushalt der Zelle eine besonders wichtige Voraussetzung darstellt.

Während der Anstieg des ATP/ADP-Quotienten eine Wiederherstellung der normalen Funktion anzeigt, deutet sein Abfall logischerweise auf eine Funktionsbeeinträchtigung hin. REIM und LICHTER fanden eine wichtige Beziehung zwischen Hornhauttrübung und Absinken des ATP/ADP-Quotienten, wobei dieser Abfall der einsetzenden und meßbaren Eintrübung etwas vorauselte, dann erst, nachdem der Quotient für die Gesamthornhaut von 4,8 auf unter 2,5 angefallen war, konnte eine leichte Trübung in der Hornhaut festgestellt werden. SÖLLNER und HOCKWIN stellten eine ähnliche Veränderung fest, allerdings haben sie nur den Anfangs- und Endzustand untersucht und die zeitlichen Korrelationen nicht berücksichtigt.

Auch in anderen Geweben wurden Veränderungen des ATP/ADP-Quotienten bei Unterbrechung der Blutzufuhr festgestellt. So zeigten HOHORST, KREUTZ und BÜCHER, daß die Rattenleber bei Ischämie mit einem sehr schnell abfallenden ATP/ADP-Quotienten reagiert, der innerhalb weniger Sekunden von über 3 auf 1,5 sank, während gleichzeitig die Redox-Quotienten L/P und G/D anstiegen. Ähnlich verhält sich auch die Tränendrüse bei Ischämie. REIM konnte feststellen, daß auch hier der ATP/ADP-Quotient sofort nach Unterbindung der Blutzufuhr von 4,8 auf 1,5 absank.

Während das Hornhautepithel in seiner Reaktionsweise - Atmung und Glykolyse - anderen Geweben ähnlich ist, scheint es jedoch einige Besonderheiten aufzuweisen. Das zeigt besonders ein Vergleich der Adenosinphosphate im Hornhautepithel mit anderen Geweben.

Gewebe	ATP	ADP	ATP/ ADP	Tierart	Literatur
Cornea- epithel	3032	264	12,2	Kaninchen	diese Arbeit
Skelett- muskel	6090	741	8,2	Ratte	HOHORST, REIM, BARTELS
Tränen- drüse	1704	367	4,8	Kaninchen	REIM (unver- öffentlicht)
Leber	2900	900	3,2	Ratte	HOHORST, KREUTZ und BÜCHER

Tab. 14:

Gehalte der Adenosinphosphate in den verschiedenen Geweben.

Dimension in nMol/g Frischgewicht

Das von uns gemessene Gewebe befindet sich auf einem besonders hohen Energiepotential, wie der hohe ATP/ADP-Quotient zeigt. Auch im Skelettmuskel ist dieses Potential noch sehr hoch, während es für Tränendrüse und Leber schon deutlich niedriger liegt. Den höchsten Gehalt an ATP zeigt der Skelettmuskel.

Die Bestimmung der Metabolite im Gewebe stellt also für die Beurteilung seiner Funktion eine wichtige Voraussetzung dar, weiterhin ist es sicher, daß sich der Metabolitgehalt bei pathologischen Gewebszuständen stark verändern kann. Die dargestellten Metabolitmuster veranschaulichen den Funktionszustand eines Gewebes und es sollte in Zukunft möglich sein, weitere Zusammenhänge zwischen Metabolitmuster und Struktur zu erkennen.

A n h a n g z u K a p i t e l V

(Abb. 11)

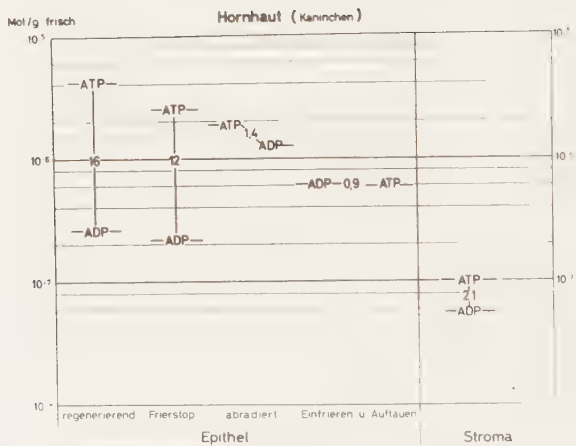


Abb. 11:

Vergleich der gemessenen ATP/ADP-Quotienten
in Epithel und Stroma.

VI. Zusammenfassung

1. Es wurden die Metabolite des Energie liefernden Stoffwechsels in der Hornhaut für das Hornhautepithel und das Hornhautstroma mit anhängendem Endothel gemessen. Die Ergebnisse sind in den Tab. 7 bis 10 und in den Abb. 3 bis 6 zusammengefaßt.
2. Der größte Teil der für die Gesamthornhaut gemessenen Metabolitgehalte scheint im Epithel lokalisiert zu sein.
3. Die Metabolitgehalte können sich im geschädigten und regenerierenden Epithel stark verändern und geben damit gleichzeitig ein Bild von den Veränderungen des Energie liefernden Stoffwechsels.
4. Der ATP/ADP-Quotient zeigte besonders auffällige Veränderungen. Normalerweise war sein Wert mit 12,2 sehr hoch. Er lag im regenerierenden Epithel noch höher und fiel nach Vereisung und Wiederauftauen der Cornea auf unter 1 ab.
5. 40 Stunden nach Vereisung erlangte das Hornhautepithel zunehmend seine Funktionsfähigkeit zurück, sichtbar an einem Anstieg des ATP/ADP-Quotienten.

Methodischer Anhang

Abb. 1: Hornhautstroma nach Epithelabrasio

Lfd. Nr.	I	P	L/P	G	D	G/D	M	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	AP	ψ_{AdK}
1	10500	31~	31,0		~1				15,00	3600	145,0	53,0	2,70	217,0	415	0,089
2	5550	192	29,0		22,0			27	16,00	4000	152,0	65,0	2,00	565,0	562	0,088
3	5110	221	25,1							3550	142,0	107,0	1,33	188,0	457	0,420
4	2040	148	19,8								86,0	57,0	1,50	505,0	648	0,095
5	9050	308	29,0	48			72			2260	108,0	74,0	1,45	190,0	372	0,267
6	9700	548	27,8	56			75		9,00	3860	114,0	47,0	2,45	111,0	272	0,175
7	8090	227	35,2	39			72		9,00	2180	106,0	32,0	3,30	84,0	222	0,012
8	5800	212	27,4	52	12,0	4,73	57		17,00	2090	91,0	39,0	2,33	67,0	197	0,250
9	6110	200	30,6		48,7					2850	109,0	46,5	2,36	77,8	233	0,252
10	7070	185	38,2						27,90	3700	101,0	86,2	1,17	10,1	107	0,728
11	8800	422	20,9							3200	115,0	107,0	1,08	467,0	689	0,215
12	6040	155	44,5						8,25	1625	50,6	30,3	1,67	71,0	152	0,254
13	8550	247	34,0							3000	106,0	35,0	2,98	119,0	260	0,100
14	5550	256	20,8		28,1				20,70	3160	80,6	29,0	2,99	124,0	279	0,078
15	6210	196	31,6						10,80	2560	77,5	44,4	1,75	67,0	180	0,300

Abb. 2: Hornhautepithel nach Abrasio in vivo (Wärmeabradat)

Lfd. Nr.	L	P	L/P	G	D	G/D	M	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	AP	η_{AdK}
1	11400	201	50,5	550	48	7,00	551	147	550	1750	1525	1090	1,400	950	3565	0,820
2	24300	950	37,1	455	150	5,15	400	555	455	1520	2050	1480	1,300	1140	4070	0,937
3	17000	645	27,4	570	200	4,55	515	554	208	2050	3050	1640	1,800	1070	5700	0,824
4	14550	885	16,5						182	1160	622	1210	0,516	2350	4182	1,002
5	25800	2250	11,4	600	208	2,55	652	201	805	550	1580	2260	0,700	3100	6940	1,045
6	60500	1720	35,1	620	132	4,74	755		585		1230	1640	0,750	1900	4770	1,151
7	24000	740	32,2	608	150	4,01	550	227	575	2840	2100	1720	1,220	1200	5020	1,173
8	11000	750	17,0	778	154	5,10	535		148		1720	1750	1,000	1420	4890	1,254
9	28500	1430	19,9	900	103	8,70	890	91	252		3300	1190	2,770	955	5445	0,449
10	48800	2110	25,1	470	170	2,78	960	117	242		2780	1110	2,500	730	4620	0,607
11	32000	645	54,5						181		1060	1060	1,000	2840	4960	0,373

Abb. 5: Hornhautepithel nach Frierstop

Exp. Nr.	L	P	L	P	G	D	G/D	M	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	AP	ψ_{AdK}
1	30480	700	43,5			75,1			191	94,9	4170	3170	321	9,90	720	4220	0,045
2	71040	1668	42,0	458								2500	199	12,60	1310	4000	0,012
3	82500	942	55,0			104,0				327,0		3060	253	12,10	1084	4390	0,016
4	72000	1080	36,2	607						118,0		3010	151	19,70	816	3980	0,009
5	62400	1488	40,8	852		178,0	4,80	600	170	159,0		3890	347	11,20	443	4680	0,070
6	39480	1248	30,5	787		139,0	5,60	842	149	110,0		2830	164	17,60	812	3800	0,011
7		978							167	474,0		2470	259	9,55	812	3540	0,034
8	22200	1038	21,4	364		102,6	3,55	1072				3710	245	15,10	1173	5120	0,014
9	25200	1224	20,5			139,0						4280	306	10,20	830	4250	0,036
10	30840	891	34,4									2480	237	10,50	1225	3950	0,019
11	35160	1218	29,0	470		92,8	5,08	386	113	81,7		3790	345	11,00	1112	5236	0,028
12	66960	1050	64,0					535				3030	443	6,90	692	4180	0,093
13	121200	1920	59,8							77,6		2440	198	12,40	570	3070	0,028
14	26520	756	35,0	450								2890	229	12,40	1380	4470	0,013

Abb. 4: Regenerierendes Hornhautepithel nach Abrasio und Frierstop

Lfd. Nr.	L	P	L/P	G	D	G/D	M	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	AP	Q _{AdK}
1	100200	1884	53,2		114				237		6540	460	14,2	1272	8272	0,026
2	33840	1296	26,1				790				6432	357	18,0	1644	8422	0,012
3	84600	2064	41,0						355		4536	244	18,5	1242	6022	0,011
4	48960	1200	40,8		97				115	15720	3072	166	18,2	336	3574	0,028
5		1248			196				223		4944	303	16,3	894	6141	0,021
6	70560	1596	44,2						152		5088	336	15,2	678	6102	0,033
7	3040	1512	20,3						138		4596	340	13,5	1512	6448	0,017

Abb. 5: Hornhautepithel nach Einfrieren und Wiederauftauen

Lfd. Nr.	L	P	L/P	G	D	G/D	M	G-6-P	FDP	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	AP	Q _{AdK}
1	44550	1154	39,6						99	510	696	0,730	1014	2220	0,937
2	80400	1608	55,5							729	776	0,940	2016	3522	0,410
3	45000	1752	25,7	280	81	3,44	722			501	506	0,990	1650	2664	0,309
4	59400	2328	25,5				544	519	129	918	1014	0,905	1980	3912	0,566
5	54240	1488	36,4	564			441		110	766	807	0,949	2136	3716	0,398
6		1077		476					78	588	651	0,902	1716	2955	0,421
7	26520	1632	16,3				553			966					

Abb. 6: Hornhautepithel nach Vereisung (Stundenvariation)

Lfd. Nr.	L	P	L.P	G	D	M	G-o-P	FBP	Glucose	ATP	ADP	ATP	AMP	AP	μ AdK	Stunden	Bemerkungen
1	44640	1112	60,2	574						375	330	1,10	1135	1250	0,271	0,5	klar, glatt
2	29160	1440	20,1		300		172	5130	464	458	1,01	1296	2178	0,349	3,5		praktisch klar zarter Schleier
3	40000	2424	10,3				260		913	500	1,55	1340	2847	0,284	15,5		diff. Trübung noch durch- sichtig
4	00000	3324	19,8		448		214		1272	964	1,32	816	3052	0,897	44,0		zarte Trübung
5	05040	2010	32,4	142			573		1374	394	3,50	1320	3088	0,086	55,0		leicht getrübt durchsichtig
6	130000	4020	27,5				300		2340	332	7,07	1056	3720	0,044	62,0		getrübt, glän- zend, glatt
7	40200	2076	22,2				296		3024	240	12,60	382	3646	0,050	67,0		feine Trübung
8	64200	2424	26,5						2784	201	15,80	614	3000	0,026	80,0		klar, glatt

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. AONO, H.:
J. ophthal. Soc. Jap. 65, 941-951
(1961 b)
2. BRÜCKE, H. VON, H.F. HELLHAUER und K. UMRATH:
Ophthalmologica (Basel) 117, 19 (1949)
3. BÜCHER, T. und M. KLINGENBERG:
Angew. Chemie 70, 552-570 (1958)
4. BULL, O.:
Ann. d'Ocul. 113, 383 (1895)
5. BUSCHKE, W.:
Arch. Ophthalm. 41, 306-316 (1949)
6. CALMETTES, L., F. DEODATI, H. PLANEL und
P. BEC:
Arch. Ophthalm. (Paris) 16, 481-506
(1956)
7. DAVSON, H.:
The hydration of the cornea.
B.J. 59, 24-28 (1955)

8. Documenta GEIGY:
5. Aufl. 1955
herseg. von: J.R. GEIGY A.G. Basel
Pharmazeutische Abteilung
9. ERÄNKÖ, O.:
Acta anat. (Basel) 22, 331 (1954)
10. FISCHER, F.P.:
Arch. Augenheilk. 103, 1 (1930)
und
Arch. Augenheilk. 107, 295 (1933)
11. FRENCH, R.C. und Z. DUMA:
Canad. J. Biochem. 41, 1005-1011 (1963)
12. HANNA, C. und J.E. O'BRIEN:
Arch. Opthal. (N.Y.) 64, 536-539
(1960)
13. HARRIS, J.E.:
Amer. J. Opthal. 44, 262-280 (1957)
14. HARRIS, J.E.:
Transport of fluid from the cornea.
in: The transparency of the cornea.
ed. DUKE-ELDER, W.S. und E.S.
PERKINS, Blackwell Oxford 1960
15. HARRIS, J.E. und L.T. NORDQUIST:
Amer. J. Opthal. 40, 100-110 (1955)

16. HEDBYS, B.O.:
Exp. Eye Research 1, 81-91 (1961)
17. HEDBYS, B.O., S. MISHIMA und D.M. MAURICE:
Exp. Eye Research 2, 99-111 (1963)
18. HERRENSCHWAND, F. VON:
Zbl. prakt. Augenkl. 40, 161 (1916)
19. HERRMANN, H. und F. HICKMAN:
Bull. John's Hopkins Hosp. 82
S. 182-207, S. 225-250 sowie S. 260-272
(1948)
20. HERRMANN, H. und P.L. LEBEAU:
J. Cell Biol. 13, 465 (1962)
21. HEYDENREICH, A.:
Die Zellmigration im Bereich der Hornhaut.
Vortrag zur 62. Zusammenkunft der
Dt. Ophthalm. Ges. Heidelberg 1959
22. HOHORST, H.J.:
Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte in der quergestreiften Muskulatur der Ratte.
Habil.-Schrift Marburg 1961
23. HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ und T. BÜCHER:
Biochem. Z. 332, 118 (1959)

24. HOHORST, H.J., M. REIM und H. BARTELS:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7
S. 137 sowie S. 142 (1962)
25. HOHORST, H.J., M. REIM, F.H. KREUTZ und
H.J. HÜBENER:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 163
(1961)
26. JAKUS, M.A.:
Amer. J. Ophthalm. 38, 40-53 (1954)
27. JAKUS, M.A.:
The fine structure of the human cornea.
in: The Structure of the Eye, ed.
SMELSER, G.K.
Academic Press New York und London
1961
28. KAMAI, T.:
Acta Soc. Ophthal. (Japan) 63, 934
(1956)
29. KANDORI, F. und T. OKAMOTO:
Yonago Acta med. 4, 81-88 (1960)
30. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Thieme Verlag Stuttgart 1962
31. KINOSHITA, J.H. und T. MASURAT:
Amer. J. Ophthalm. 48, 47-52 (1956)

32. KRZAWICZ, F.:
Brit. J. Ophthal. 45, 279 (1961)
33. LANGHAM, M.E.:
J. Physiol. 126, 396-403 (1954)
34. LANGHAM, M.E.:
Corneal metabolism and its influence
on corneal hydration in the excised
eye and in the living animal.
in: The transparency of the cornea,
ed. DUKE-ELDER, W.S. und E.S.
PERKINS
Blackwell Oxford 1960
35. LANGHAM, M.E. und I.S. TAYLOR:
Brit. J. Ophthal. 40, 321-340 (1956)
36. LA TESSA, A.J. und M.H. ROSS:
Exp. Eye Research 3, 298 (1964)
37. LAVIGERIE, D. DE:
Ann. Ocul. 113, 274 (1895)
38. LICHTHE, H.:
Beziehungen zwischen Energiestoffwech-
sel und Trübung in der Kaninchenhorn-
haut.
Inaug. Diss. Marburg 1966

39. MAURICE, D.M.:

The permeability of the cornea.
in: The transparency of the cornea,
ed. DUKE-ELDER, W.S. und E.S.
PERKINS
Blackwell Oxford 1960

40. MAURICE, D.M.:

The cornea and sclera.
in: The eye, ed. DAVSON, H.
Vol. I, Acad. Press New York und
London 1962

41. MAURICE, D.M. und A. GIARDINI:

Brit. J. Ophthal. 35, 791-797 (1951)

42. MORLEY, N.H. und A. TOTH:

Canad. J. Biochem. 39, 447 (1961)

43. NAYLOR, E.J.:

Brit. J. Ophthal. 37, 77-84 (1953)

44. PAU, H.:

A. v. Graefes Arch. Ophthal. 154, 579
(1954)

45. PEDLER, C.:

Exp. Eye Research 1, 286 (1962)

46. PHILPOT, F.J.:

J. Physiol. 128, 504-510 (1955)

47. PIRIE, A. und R. VAN HEYNINGEN:
Biochemistry of eye.
Blackwell Oxford 1956
48. REIM, M.:
A. v. Graefes Arch. Ophthal. 167,
S. 549-558 sowie S. 559-563 (1964)
49. REIM, M.:
pers. Mitteilung
50. REIM, M. und H. LICHTHE:
A. v. Graefes Arch. Ophthal. 168, 365
(1965)
51. REIM, M. und H.P. SCHRAMM:
A. v. Graefes Arch. Ophthal. 168, 185-
197 (1965)
52. RHODIN, J.A.G.:
Atlas of ultrastructure.
W.B. Saunders Co. Philadelphia und
London 1963
53. ROHEN, J.W.:
Handbuch der mikroskopischen Anatomie
des Menschen.
Band III: Haut und Sinnesorgane (Teil 4),
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidel-
berg-New York 1964

54. SCHWARZ, W.:
Z. Zellforsch. 38, S. 20-49 sowie
S. 78-86 (1953)
55. SÜLLNER, F. und O. HOCKWIN:
A. v. Graefes Arch. Ophthal. 167,
467 (1964)
56. STAUBESAND, J.:
Verh. anat. Ges., 57. Vers. Hamburg
Anat. Anz. Suppl. 111, 393 (1962)
57. STRAUB, W.:
Klin. Mbl. Augenkl. 144, 251 (1964)
58. STRAUB, W.:
Kryothérapie des ulcères cornéens
graves.
Congr. Soc. Franç. Ophthal. (SFO) Paris
1965
59. STRAUB, W.:
Kälteschäden und Kältetherapie des
Auges. Experimentelle und klinische
Untersuchungen.
Klin. Mbl. Augenkl. (im Druck)
60. SÜLLMANN, H.:
Auge und Tränen.
in: Handb. der physiol. Chemie, hersg.
von FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ, Band II/
2 a, S. 867 ff.
Springer Verlag Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1956

61. TANAKA, N.:
Acta Soc. Ophthal. Jap. 67, 685-697
(1963)
62. TENG, C.C.:
Amer. J. Ophthalm. 51, 278-297 (1961)
63. VIRCHOW, H.:
in: Handbuch der gesamten Augenheil-
kunde, hersg. von GRAEFE-SAEMISCH,
Band I/1. Abteilung, 2. Aufl.
Engelmann Leipzig 1910
64. WALBEEK, K. VON und G.C. HERINGA:
Turgescence and swelling pressure.
in: The transparency of the cornea,
ed. DUKE-ELDER, W.S. und E.S.
PERKINS
Blackwell Oxford 1960
65. WARBURG, O.:
Z. Enzymforsch. 7, 210 (1938)
66. WEEKERS, R.:
Récherches experimentales et cliniques
concernant la pathogénie des cataractes.
Thèse d'Agrégation, Université Liège
1941
zit. nach: PIRIE, A. und R. VAN
HEYNINGEN: Biochemistry of
the eye.
Blackwell Oxford 1956

67. WEIMAR, V.:

Healing processes in the cornea.

in: Transparency of the cornea,

ed. DUKE-ELDER, W.S. und E.S.

PERKINS

Blackwell Oxford 1960

A b k ü r z u n g e n

AdK	Adenylatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
ALD	Aldolase
AMP	Adenosinmonophosphorsäure
ATP	Adosintriphosphorsäure
DAP	Dihydroxyacetonphosphorsäure
DPN ⁺	Diphosphopyridinnucleotid oxydiert
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid reduziert
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
ENO	Enolase
FDP	Fructosediphosphorsäure
GAP	Glycerinaldehydphosphorsäure
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-De- hydrogenase
GDH	Glycerin-1-phosphat-Dehydro- genase
GSH	Glutathion
α-GP = G-1-P	Glycerin-1-phosphorsäure
G-6-P	Glucose-6-phosphorsäure
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydro- genase
HK	Hexokinase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase

MK	Myokinase (Adenylatkinase)
OAA	Oxalessigsäure
PEP	Phosphoenolbrenztrauben- säure
PGK	Phosphoglycenatkinase
PK	Pyruvatkinase
TIM	Triosephosphatisomerase
TPN ⁺	Triphosphopyridinnucleotid oxydiert
TPNH	Triphosphopyridinnucleotid reduziert
TRAP	Triäthanolaminpuffer
ZF	Zwischenferment

Die Operationsphotographien des methodi-
schen Teils dieser Arbeit machte ich mit der
EDIXA-Spiegelreflex-Kleinbildkamera
Schneider 1 : 2.8 / 50 mm
Zwischenringe 1, 2, 3, 4
Elektronenblitz
Filmmaterial: ADOX KB 17

Herrn Professor Dr. med. W. Straub, Direktor der Augenklinik der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dozent Dr. med. M. Reim, der mich in die Methodik der Arbeit im biochemischen Labor einführte und darüber hinaus trotz anstrengender Arbeit in der Klinik immer noch Zeit fand, mir - auf Grund seiner Erfahrungen und Kenntnisse auf dem Sektor der Biochemie - wertvolle Rat-schläge zu geben.

Der biologisch-technischen Assistentin, Frau H. Cattepoel, sowie der medizinisch-technischen Assistentin, Frau M. Ursprung, danke ich für ihre Assistenz.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Beckmann, Berendes, Bickel, Braun-Falco,
Brück, Buchholz, Bücher, Dimroth, Dittrich,
Dölle, du Mesnil de Rochemont, Exner,
Gedigk, Golenhofen, Hamm, Hensel, Heuser,
Hildebrandt, Hohorst, Hornung, Jacob,
Klingenberg, Kottmeyer, Lang, Linneweh, Löhr,
Lübbbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes,
Neubauer, Petry, Rodenhäuser, Rohen,
Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert,
Siess, Straub, Streicher, Strohmeier, Vogt,
Walcher, Wendt

in Göttingen:

Bushe, Doering, Ebert, Frischkorn, Fuchs,
Geller, Hellner, Henne, Kirchhoff, Kleinsorg,
Koncz, Lendle, Linzbach, Schmidt-Matthisen,
Schoen, Schröder, Schwab, Witt

in Wien:

Chiari, Braitenberg, Fellingner, Fuchsig,
Hruby, Kraus, Kucsko, Langer, Moritsch,
Neuhold, Novotny, Übelhör, Ullik

Lebenslauf

Am 27.6.1942 wurde ich als Sohn des Gewerbe-
oberlehrers Friedrich Schmidt und seiner
Ehefrau Paula, geb. Krömker, in Barkhausen
an der Porta Westfalica geboren.

Von Ostern 1948 bis Ostern 1952 besuchte ich
die Gemeinschaftsschule in Barkhausen/Porta,
danach das Staatliche Bessel-Gymnasium in
Minden/Westfalen. Ostern 1961 bestand ich am
neusprachlichen Zweig dieses Gymnasiums die
Reifeprüfung.

Vom Sommersemester 1961 bis zum Winterseme-
ster 1963/64 studierte ich an der Philipps-
Universität in Marburg a. d. Lahn. Nach zwei
Semestern bestand ich dort das Vorphysikum,
nach drei weiteren Semestern das Physikum.
Im Wintersemester 1963/64 besuchte ich die
Georg-August-Universität in Göttingen, im
Sommersemester 1964 studierte ich an der
Universität Wien. Im Wintersemester 1964/65
kehrte ich zur Philipps-Universität nach
Marburg a. d. Lahn zurück.

Während der Semesterferien famulierte ich
an der Inneren und Geburtshilflich-Gynäkologi-
schen Abteilung des Zweckverbandes 'Stadt-

und Kreiskrankenhaus Minden', in der Augenklinik der Philipps-Universität Marburg a. d. Lahn sowie an der Chirurgischen Universitätsklinik in Pavia (Italien).

Das medizinische Staatsexamen legte ich im Wintersemester 1966/67 an der Philipps-Universität in Marburg a. d. Lahn ab. Es war am 31.1.1967 beendet.

